

**Unterkühlt-Smektische Lipid-Nanopartikel:
Entwicklung und Charakterisierung eines neuartigen Trägersystems für
schwer wasserlösliche Arzneistoffe**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Judith Kuntsche
geboren am 16.08.1968 in Schwerin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Heike Bunjes, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Alfred Fahr, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Karsten Mäder, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eingereicht am 08. Mai 2006

Rigorosum am 08. Juni 2006

Öffentliche Verteidigung am 12. Juli 2006

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Kirsten Westesen und Frau Prof. Dr. Heike Bunjes am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kirsten Westesen für die Zuweisung des Themas und die Ermöglichung einer weitgehend selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit.

Frau Prof. Dr. Heike Bunjes möchte ich herzlich danken für die Übernahme und Betreuung der Doktorarbeit nach dem Tod von Prof. Westesen sowie für die konstruktive Kritik und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Alfred Fahr möchte ich danken für die Arbeitsmöglichkeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie nach seiner Berufung an die Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie die Initiierung meines Forschungsaufenthaltes an der Universität Kuopio im Rahmen des GALENOS Programms. Herrn Prof. Dr. Wahl danke ich für die Unterstützung der Arbeit während seiner Tätigkeit am Lehrstuhl nach dem Tode von Frau Prof. Dr. Westesen.

Herrn Dr. Michel H.J. Koch, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), danke ich ganz herzlich für die Arbeitsmöglichkeiten im Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) des Deutschen Elektronen Synchrotrons (DESY), für die Unterstützung bei den Röntgenexperimenten sowie die wertvollen Ratschläge und Diskussionen.

Für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. Markus Drechsler, Diplom-Ingenieur Frank Steiniger und Frau Steffi Richter. Mein besonderer Dank gilt Frau Steffi Richter für die Einarbeitung in die Gefrierbruchtechnik.

Frau Angela Herre gilt mein Dank für ihre Unterstützung in der Zellkultur. Herrn Dr. Thomas Appel danke ich für die Bereitstellung der Methode und der Materialien für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Karin Rosenblatt und Silvia Petersen danke ich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Trägersysteme für schwer wasserlösliche Arzneistoffe	3
2.1.1	Kolloidale Fettemulsionen	5
2.1.2	Feste Lipid-Nanopartikel (SLN – Solid Lipid Nanoparticles)	6
2.1.3	Liposomen	8
2.1.4	Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und Emulsionen proteinfreier LDL-ähnlicher Partikel als Arzneistoffträgersysteme	10
2.2	Der thermotrop flüssigkristalline Zustand – ein kurzer Überblick	13
3	Materialien und Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Matrixlipide – Cholesterolester	17
3.1.2	Stabilisatoren	18
3.1.3	Arzneistoffe	21
3.1.4	Wasseraufbereitung	22
3.1.5	Sonstige Stoffe	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Herstellung der Dispersionen	24
3.2.2	Autoklavierung ausgewählter Dispersionen	26
3.2.3	Ultrazentrifugation	27
3.2.4	Partikelgrößenanalyse	27
3.2.5	Bestimmung des Zetapotentials	29
3.2.6	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	29
3.2.7	Röntgendiffraktometrie mit Synchrotronstrahlung	31
3.2.8	Rheologische Untersuchungen	31
3.2.9	Lichtmikroskopische Untersuchungen	32
3.2.10	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	32
3.2.11	Chromatographische Methoden	34

3.2.12	Messung des pH-Wertes	37
3.2.13	Messung der Osmolalität	37
3.2.14	Zellkultur und Untersuchungen der in vitro-Zytotoxizität	37
4	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1	Untersuchungen der Rohmaterialien	42
4.1.1	Phasenverhalten der verwendeten Cholesterolester	43
4.1.2	Wechselwirkungen von Cholesterylmyristat mit ausgewählten Stabilisatoren	51
4.1.3	Viskositätsuntersuchungen	53
4.1.4	Zusammenfassung und Diskussion	55
4.2	Eigenschaften kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel	64
4.2.1	Partikelgröße	64
4.2.2	Phasenverhalten	64
4.2.3	Physikochemischer Zustand der Partikel	66
4.2.4	Zusammenfassung und Diskussion	67
4.3	Einfluss der Herstellungsbedingungen auf die Eigenschaften smektischer Cholesterylmyristat-Partikel	69
4.3.1	Herstellung durch Schmelzhomogenisation	70
4.3.2	Herstellung mit dem Emulsions-Fällungs-Verfahren	74
4.3.3	Zusammenfassung und Diskussion	79
4.4	Einfluss des Stabilisatorsystems auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel	83
4.4.1	Phospholipide und Phospholipid-Gallensalz-Gemische	84
4.4.2	Polyvinylalkohol (Mowiol)	106
4.4.3	Poloxamer und Poloxamin	110
4.4.4	Gelatinepolysuccinat und Natriumcaseinat	112
4.4.5	Tween 80	113
4.4.6	Natriumoleat	116
4.4.7	Zuckertensid	118
4.4.8	Natriumglycocholat	120
4.4.9	Einfluss des Stabilisatorsystems auf die Röntgenkleinwinkelstreuung	122

4.4.10	Zusammenfassung und Diskussion	123
4.5	Einfluss der Matrixzusammensetzung auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten kolloidaler Cholesterolester-Partikel	133
4.5.1	Makroskopisches Aussehen und Partikelgröße nach Herstellung der Dispersionen	135
4.5.2	Phasenverhalten der Dispersionen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipid-Matrix	135
4.5.3	Abhängigkeit der Röntgenkleinwinkelreflexe von der Zusammensetzung der Lipid-Matrix	140
4.5.4	Ultrastruktur	142
4.5.5	Lagerstabilität	142
4.5.6	Zusammenfassung und Diskussion	145
4.6	Einarbeitung von Modell-Arzneistoffen in smektische Nanopartikel	149
4.6.1	Makroskopisches Aussehen und Partikelgröße nach Herstellung der Dispersionen	149
4.6.2	Einfluss der Arzneistoffbeladung auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten der smektischen Nanopartikel	151
4.6.3	Ultrastruktur ibuprofenbeladener Cholesterylmyristat-Nanopartikel	154
4.6.4	Lagerstabilität	155
4.6.5	Gehaltsbestimmung der arzneistoffbeladenen Dispersionen	155
4.6.6	Zusammenfassung und Diskussion	157
4.7	Höher konzentrierte Dispersionen smektischer Nanopartikel	161
4.8	Autoklavierung und Stabilität gegenüber thermischer Belastung	165
4.8.1	Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Dispersionen	165
4.8.2	Polymerstabilisierte Dispersionen	170
4.8.3	Zusammenfassung und Diskussion	171
4.9	Untersuchungen zur in vitro-Zytotoxizität	175
4.9.1	Voruntersuchungen	176
4.9.2	Zytotoxizität ausgewählter smektischer Nanopartikel im Vergleich zu Lipofundin [®] MCT	178
4.9.3	Zusammenfassung und Diskussion	181

4.10	Überlegungen zu den Partikelgrößenbestimmungen	184
5	Abschlussdiskussion	188
6	Zusammenfassung	194
	Literaturverzeichnis	196
	Anhang	211
A.1.	Zusammensetzung, Herstellungsbedingungen und mittlere Partikelgröße der Dispersionen	
A.2.	Ausgewählte Ergebnisse der DSC-Untersuchungen	219
A.3.	Röntgenkleinwinkelreflexe ausgewählter Dispersionen	225
A.4.	Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen	227
A.5.	Gleichungen und Formeln der Statistik	230
A.6.	Verwendete Abkürzungen	231
	Lebenslauf	232
	Selbstständigkeitserklärung	233

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Kolloidale Lipid-Emulsionen und Dispersionen fester Lipid-Nanopartikel, die als Trägersysteme für schwer wasserlösliche Arzneistoffe untersucht werden, erscheinen insbesondere im Hinblick auf ihre physiologische Verträglichkeit gegenüber anderen kolloidalen Trägersystemen wie beispielsweise Polymer-Nanopartikeln von Vorteil. Kolloidale Fettemulsionen werden seit langem für die parenterale Ernährung eingesetzt und sind auch geeignet für die Solubilisierung lipophiler Arzneistoffe [Prankerd und Stella 1990, Floyd und Jain 1996, Klang und Benita 1998]. Während der flüssige Zustand der Lipidmatrix einerseits eine hohe Aufnahmekapazität für Arzneistoffe aufweist, ist er jedoch mit einigen Nachteilen wie beispielsweise der hohen Mobilität inkorporierter Arzneistoffmoleküle und einem möglichen Partikelgrößenwachstum aufgrund von Koaleszenz der Emulsionspartikel verbunden. Um eine langsamere Freisetzung von inkorporierten Arzneistoffen sowie auch eine höhere Stabilität der Nanopartikel zu erzielen, dabei aber auch die Vorteile der kolloidalen Fettemulsionen insbesondere im Hinblick auf die physiologische Verträglichkeit zu bewahren, wurden Anfang der 90er Jahre Lipid-Nanopartikel mit einer festen Matrix eingeführt [Westesen 2000, Müller et al. 2000, Mehnert und Mäder 2001]. Aufgrund der meist hochgeordneten, kristallinen Matrix ist die Aufnahmekapazität für Arzneistoffe in diese Nanopartikel jedoch begrenzt.

Um die Aufnahmekapazität von Arzneistoffen in feste Lipid-Nanopartikel zu erhöhen, wurden Lipid-Nanopartikel aus Gemischen von festen und flüssigen Lipiden entwickelt, wobei angenommen wird, dass die flüssigen Lipide als "Nano-Kompartimente" in der festen Lipidmatrix eingebettet vorliegen [Müller et al. 2002]. Untersuchungen zur Ultrastruktur von Compritol-Nanopartikeln, denen unterschiedliche Mengen mittelkettiger Triglyceride (MCT) zugemischt wurden, haben allerdings gezeigt, dass es zumindest bei höheren Konzentrationen von MCT zu einem Austritt der flüssigen Lipide aus der kristallinen Matrix kommt [Jores et al. 2003, 2004].

Eine weitere, viel versprechende Alternative bietet der flüssigkristalline Zustand der Lipidmatrix. Der Ordnungsgrad der flüssigkristallinen Struktur bedingt eine vergleichsweise hohe Viskosität und damit eine eingeschränkte Beweglichkeit eingeschlossener Arzneistoffmoleküle. Andererseits sollte durch die Fluidität auf molekularer Ebene die Aufnahmekapazität für Fremdmoleküle im Vergleich zum hoch geordneten kristallinen Zustand höher sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines wässrigen kolloidalen Arzneistoffträgersystems, dessen Lipidpartikel in einem thermotrop flüssigkristallinen (smektischen) Zustand vorliegen und das insbesondere auch für eine parenterale Applikation geeignet sein sollte.

Für die Herstellung der Nanopartikel wurden Cholesterolester verwendet. Viele Cholesterolester sind physiologische Lipide und können thermotrop flüssigkristalline Phasen (smektische und cholesterische Phasen) bilden. Cholesterolester sind Hauptbestandteil der Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und verantwortlich für den in thermoanalytischen und röntgendiffraktometrischen Untersuchungen beobachteten Phasenübergang humaner LDL zwischen ca. 15 und 36 °C [Deckelbaum et al. 1977, Atkinson et al. 1977, Prassl et al. 1995].

Mit Ausnahme des Cholesteryloleats, dessen kristallin-flüssigkristalliner Phasenübergang nahe Körpertemperatur liegt, weisen alle anderen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cholesterolester Schmelztemperaturen deutlich oberhalb von Raumtemperatur auf. Aufgrund der stark verzögerten Kristallisation im kolloidalen Zustand [Bunjes et al. 1998] kann der flüssigkristalline Zustand der Nanopartikel auch bei Raumtemperatur erhalten werden [Snow und Philips 1990]. Der unterkühlte Zustand ist jedoch metastabil, so dass die Partikel über den Lagerungszeitraum zur Rekristallisation neigen können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und unter welchen Voraussetzungen (Partikelgröße, Stabilisatorsystem, Matrixzusammensetzung) der unterkühlte smektische Zustand der Nanopartikel für einen für pharmazeutische Zwecke angemessenen Zeitraum erhalten werden kann.

Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren neben der physikochemischen Charakterisierung der smektischen Nanopartikel Untersuchungen:

- zum Kristallisationsverhalten sowie Einflussfaktoren wie Stabilisatorsystem und Matrixzusammensetzung auf die Kristallisation,
- zur Stabilität, insbesondere auch hinsichtlich der Rekristallisationstendenz über Langzeitlagerung,
- zum Einfluss der Herstellungsbedingungen im Hinblick auf eine geeignete Partikelgröße und Stabilität der Dispersionen sowie
- zum Einbau ausgewählter Modell-Arzneistoffe in die Dispersionen.

Da die Dispersionen insbesondere auch für eine parenterale Applikation geeignet sein sollten, wurden ausgewählte Dispersionen hinsichtlich ihrer Stabilität nach Autoklavierung untersucht. Für eine erste Abschätzung der physiologischen Verträglichkeit wurde die in vitro-Zytotoxizität ausgewählter Dispersionen in einem Zellkulturmodell mit der einer kommerziell erhältlichen Fett-Emulsion für die parenterale Gabe verglichen.

ALLGEMEINER TEIL

2.1 Trägersysteme für schwer wasserlösliche Arzneistoffe

Viele Arzneistoffe und andere biologisch aktive Substanzen weisen eine sehr geringe Wasserlöslichkeit auf. Für die Applikation solcher Stoffe sind geeignete galenische Formulierungen oder Arzneistoffträgersysteme notwendig, um eine ausreichende Bioverfügbarkeit sicherzustellen oder eine parenterale Gabe zu ermöglichen. Neben einer Veränderung der Löslichkeitseigenschaften der Arzneistoffe durch Salzbildung oder durch chemische Derivatisierung, die jedoch mit der Schaffung völlig neuer chemischer Substanzen verbunden ist, können schwer wasserlösliche Arzneistoffe auch unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Co-Solventien oder von Lösungsvermittlern wie beispielsweise Tensiden in einem wässrigen Medium in Lösung gebracht werden [Myrdal und Yalkowsky 2002]. Nachteilig sind die oft schlechte Verträglichkeit der notwendigen Hilfsstoffe sowie mögliche Instabilitäten bei der stattfindenden Verdünnung im Blutstrom nach Injektion der Formulierung oder auch schon bei der Herstellung einer applikationsfertigen Infusionslösung.

Diese Problematik soll im Folgenden kurz anhand von Paclitaxel, einem Arzneistoff von hoher klinischer Relevanz, näher dargestellt werden. Kolloidale Trägersysteme können eine Alternative für die Verarbeitung solcher Stoffe darstellen. Die derzeitige Handelsform Taxol[®] dieses sehr schwer wasserlöslichen, antineoplastischen Wirkstoffs enthält den Arzneistoff in einer Mischung von Cremophor EL und wasserfreiem Ethanol gelöst (50:50% V/V [Rote Liste 2003]). Taxol[®] wird mittels langsamer intravenöser Infusion appliziert, wobei zuvor das Arzneistoffkonzentrat mit physiologischer Kochsalz-, Glucose- oder Ringerlösung verdünnt wird. Taxol[®]-Infusionen sind häufig mit Überempfindlichkeitsreaktionen verbunden, die unter anderem auf das Cremophor EL zurückgeführt werden. Sie erfordern eine intensive Begleitmedikation. Aufgrund der möglichen Ausfällung von Paclitaxel-Kristallen wird die Infusionslösung unter Verwendung eines In-Line-Filters appliziert. In einer Studie von Szebeni et al. mit unterschiedlich hoch konzentrierten Taxol[®]-Verdünnungen wurden licht- und elektronenmikroskopisch in allen Präparationen nadelförmige Paclitaxel-Kristalle nachgewiesen [Szebeni et al. 2001]. Wegen dieser mit der kommerziell erhältlichen Formulierung auftretenden Probleme wurde schon frühzeitig nach alternativen Paclitaxel-Formulierungen gesucht [Nuijen 2001]. Unter anderem wurden verschiedene kolloidale Trägersysteme, wie kolloidale Emulsionen [Tarr et al. 1987, Constantinides et al. 2000],

Polymer-Nanopartikel [Mu und Feng 2003], Polymer-Mizellen [Shuai et al. 2004, Adams et al. 2003], feste Lipid-Nanopartikel [Cavalli et al. 2000, Miglietta et al. 2000] sowie Liposomen [Sharma und Straubinger 1994, Campbell et al. 2001] hinsichtlich ihrer Eignung als Vehikel für diesen Arzneistoff untersucht.

Kolloidale Arzneistoffträgersysteme sind nanopartikuläre Vehikel in einem wässrigen Dispersionsmedium. Sie sind – unter Voraussetzung einer geeigneten chemischen Zusammensetzung und ausreichend geringer Partikelgröße – für eine parenterale, insbesondere auch intravenöse Gabe geeignet. Häufig wird neben der Solubilisierung der Arzneistoffe auch eine Anreicherung des Wirkstoffs an seinem Wirkort (Drug Targeting) angestrebt, um bei einer erhöhten Wirksamkeit gleichzeitig toxische Nebenwirkungen zu reduzieren. Es wird zwischen passivem und aktivem Drug Targeting unterschieden [Crommelin et al. 2001, Yokoyama 2005]. Aufgrund ihrer geringen Größe und unter Voraussetzung geeigneter Oberflächeneigenschaften, die eine ausreichend lange Zirkulation im Blutkreislauf gewährleisten, können sich Nanopartikel nach intravenöser Gabe passiv in Geweben anreichern, deren Gefäßendothel aufgrund entzündlicher oder infektiöser Prozesse geschädigt ist oder eine höhere Permeabilität aufweist wie beispielsweise in Tumorgeweben [Yokoyama 2005, Maeda 2001]. Für eine gezielte Anreicherung kolloidaler Träger im Zielgewebe (aktives Targeting) werden spezielle Liganden, die an die Oberfläche der Kolloide gebunden sind und eine hohe Affinität für das Zielgewebe aufweisen, untersucht [Crommelin et al. 2001, Nobs et al. 2004].

Der Begriff "Nanopartikel" bezog sich ursprünglich auf kolloidale Systeme basierend auf (meist bioabbaubaren) Polymeren [Kreuter 1994, Allémann et al. 1995, Soppimath et al. 2001]. Arzneistoffe können in der Polymer-Matrix eingebettet bzw. gelöst vorliegen oder auch an die Polymer-Matrix gebunden sein. In Nanokapseln ist ein Arzneistoffreservoir von einer Polymerhülle umschlossen. Für die Herstellung solcher Polymer-Nanopartikel werden insbesondere bioabbaubare Polymere wie z.B. Polylactide, Polylactid-Coglycolide sowie Polycyanoacrylate eingesetzt. In neueren Entwicklungen werden auch andere, natürlich vorkommende hydrophile Polymere wie beispielsweise Chitosan, Gelatine sowie Natriumalginate für die Herstellung von kolloidalen Arzneistoffträgern verwendet [Soppimath et al. 2001]. Die Herstellung von Polymer-Nanopartikeln kann sowohl durch Emulsions-Fällungs-Verfahren einer Lösung der entsprechenden Polymere in einem organischen Lösungsmittel als auch durch Emulsionspolymerisation der Monomere erfolgen. Um die Verwendung toxikologisch bedenklicher Lösungsmittel bei der Herstellung zu umgehen, wurden Verfahren entwickelt, die Rückstände organischer Lösungsmittel in den Dispersionen

weitgehend vermeiden [Soppimath et al. 2001]. Neben den Risiken möglicher Rückstände organischer Lösungsmittel aus dem Herstellungsprozess erscheinen bei durch Emulsionspolymerisation hergestellten Nanopartikeln mögliche Rückstände toxischer Monomere bedenklich. Im Hinblick auf die physiologische Verträglichkeit stellen lipidbasierte kolloidale Systeme eine Alternative zu den Polymer-Nanopartikeln dar. Neben der Verwendung ausschließlich physiologischer Matrixlipide sowie Stabilisatoren (beispielsweise Phospholipide und Gallensalze), können diese Dispersionen ohne Verwendung organischer Lösungsmittel durch Schmelz-Hochdruckhomogenisation hergestellt werden [Mehnert und Mäder 2001]. Im Folgenden sollen ausgewählte kolloidale lipidbasierte Trägersysteme näher vorgestellt werden.

2.1.1 Kolloidale Fettemulsionen

Kolloidale Fettemulsionen werden seit langem für die parenterale Ernährung eingesetzt [Carpentier und Dupont 2000] und können auch für die Solubilisierung lipophiler Arzneistoffe verwendet werden [Pranker und Stella 1990, Floyd und Jain 1996, Klang und Benita 1998]. Für einige Arzneistoffe wie beispielsweise für Propofol (Diprivan[®]), Diazepam (Diazemuls[®], Diazepam-Lipuro[®]) und Etomidat (Etomidat[®]) sind Emulsionsformulierungen kommerziell erhältlich und in klinischer Anwendung [Rote Liste 2003].

Arzneistoffbeladene Fettemulsionen können prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt werden: Erstens durch eine de novo-Herstellung, bei der der Arzneistoff nach Lösen in der Fettphase mit einer wässrigen Phase homogenisiert wird und zweitens durch eine nachträgliche Beladung einer wirkstofffreien Fettemulsion durch die Zugabe einer wirkstoffhaltigen Lösung (in situ-Herstellung). Im letzteren Fall ist eine Veränderung des kolloidalen Systems durch die Zugabe des meist organischen Lösungsmittels nicht auszuschließen, so dass für die Entwicklung einer arzneistoffhaltigen Fettemulsion immer eine de novo-Herstellung anzustreben ist.

Aufgrund des flüssigen Zustandes der Matrixlipide weisen die in den Emulsionstropfen eingelagerten Arzneistoffmoleküle eine hohe Mobilität auf, was zu einer Wanderung der Arzneistoffmoleküle in die Grenzschicht der Tropfen mit nachfolgender Instabilisierung des Systems führen kann. Auch wird meist eine sehr schnelle Arzneistofffreisetzung gefunden [Magenheim et al. 1993, Hosokawa et al. 2003].

Ein weiteres potentiell Trägersystem für lipophile Arzneistoffe stellen kolloidale Emulsionen unterkühlter Triglyceridschmelzen dar [Bunjes et al. 1998, Westesen et al. 2001]. Diese Systeme beruhen auf der sehr starken Unterkühlungstendenz der isotrop flüssigen Phase im kolloidalen Zustand [Bunjes et al. 1998]. So wurde beispielsweise für kolloidale Trilaurin-

Dispersionen, die mit gereinigtem Soja-Lecithin in Kombination mit einem Gallensalz oder Tyloxapol stabilisiert und mittels Schmelzhomogenisation hergestellt wurden, auch bei einer Lagerung im Kühlschrank (4 °C) über einen Lagerungszeitraum von 2 Jahren nur eine sehr geringfügige Rekristallisation beobachtet, obwohl das Lipid in der Bulkphase bei Raumtemperatur im festen Zustand vorliegt [Bunjes et al. 1998]. Trotz der höheren Viskosität der stark unterkühlten Schmelzen sollten diese Systeme bezüglich Aufnahmekapazität sowie Arzneistofffreisetzung ähnliche Eigenschaften aufweisen wie die parenteralen Fettemulsionen, die als Fett-Komponente meist Soja-Öl sowie länger- und mittelkettige synthetische Triglyceride enthalten. Ein potentieller Vorteil dieser Systeme ist die definierte Zusammensetzung der Lipidmatrix aus nur einer Komponente, die in hoher Reinheit kommerziell erhältlich ist. Auf dem gleichen Unterkühlungseffekt der geschmolzenen isotropen Phase im kolloidalen Zustand beruht eine Emulsionsformulierung von Ubidecarenon [Siekmann und Westesen 1995, Bunjes et al. 1998, Hammer 2002].

Constantinides et al. beschreiben eine interessante Emulsionsformulierung für Paclitaxel [Constantinides et al. 2000]. Als Matrixlipid wurde α -Tocopherol verwendet, das einerseits eine vergleichsweise hohe Löslichkeit für Paclitaxel aufweist (die Emulsionen enthalten 8-10 mg/ml Paclitaxel) und das andererseits aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften hinsichtlich der Verträglichkeit der Formulierung von Vorteil sein könnte. Die Emulsionen wiesen eine hohe Stabilität über 12 Monate auf und im Tiermodell (Maus) wurde im Vergleich zu der kommerziell erhältlichen Formulierung eine bessere Verträglichkeit beobachtet, zugleich jedoch eine höhere Tumoraktivität (B16 Melanom-Modell).

2.1.2 Feste Lipid-Nanopartikel (SLN – Solid Lipid Nanoparticles)

Suspensionen kolloidaler Lipid-Partikel [Westesen 2000, Müller et al. 2000, Mehnert und Mäder 2001] wurden insbesondere im Hinblick auf eine verzögerte Arzneistofffreisetzung und eine gezielte Anreicherung des Wirkstoffs in speziellen Organen (Drug Targeting) entwickelt. Gegenüber Polymer-Nanopartikeln, deren Untersuchung die gleiche Zielstellung verfolgt, weisen Lipid-Nanopartikel den Vorteil auf, dass sie ausschließlich aus physiologischen Bestandteilen ohne Verwendung von organischen Lösungsmitteln hergestellt werden können. Als Matrixlipide werden beispielsweise reine gesättigte Triglyceride [Bunjes 1998, Schwarz 1995], Hartfette, komplexe Glyceridgemische [Westesen et al. 1997a, Schwarz 1995] sowie längerkettige gesättigte Fettsäuren [Gasco und Trotta 1986, Trotta et al. 2003] eingesetzt. Die Herstellung kann durch Hochdruckhomogenisation der in der wässrigen Phase vordispersierten geschmolzenen Lipide erfolgen (Schmelzhomogenisation). Alternativ ist eine Hochdruckhomogenisation der durch Mahlen vorzerkleinerten festen Lipide möglich

[Müller et al. 1997c], die insbesondere für die Inkorporation von hydrophilen Arzneistoffen, wie beispielsweise Peptiden, in die Lipidmatrix vorgeschlagen wird [Müller et al. 1997d].

Neben der Hochdruckhomogenisation, die den Vorteil einer relativ unkomplizierten Überführung der Herstellung in den Großmaßstab (scaling up) erlaubt, finden sich in der Literatur weitere Herstellungsmethoden. Gasco beschreibt beispielsweise die Herstellung der Lipid-Suspensionen durch Ausfällung fester Lipid-Nanopartikel aus o/w-Mikroemulsionen [Gasco und Trotta 1986, Gasco 1993]. Bei der Verdünnung der erwärmten transparenten Mikroemulsion, die meist aus der Mischung einer Fettsäure (Matrixlipid der SLN), einem Emulgator, Co-Emulgator und Wasser besteht, werden mit einer kalten wässrigen Phase die festen Lipid-Nanopartikel ausgefällt [Gasco 1993]. Eine weitere Methode ist die Herstellung fester Lipid-Nanopartikel über eine sog. Lösungsmittel-Diffusionstechnik [Trotta et al. 2003]. Bei dieser Methode wird eine Prä-Emulsion hergestellt, die neben dem Matrixlipid und den Stabilisatoren Benzylalkohol bzw. Butylacetat als organisches Lösungsmittel enthält. Die Ausfällung fester Lipid-Nanopartikel erfolgt durch schnelle Zugabe von Wasser zu der Prä-Emulsion. Bei beiden Methoden werden die erhaltenen festen Lipid-Nanopartikel anschließend durch Ultrafiltration aufgereinigt. Ein weiteres Herstellungsverfahren ist das Emulsions-Fällungsverfahren [Sjöström und Bergenstahl 1992, Siekmann und Westesen 1996]. Hierbei werden das Lipid und lipophile Stabilisatoren sowie Arzneistoffe in einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel gelöst, diese Lösung mit der wässrigen Phase hochdruckhomogenisiert und das organische Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck abgedampft.

Aufgrund der hochgeordneten kristallinen Matrix sollte die Aufnahmekapazität von Arzneistoffen in feste Lipid-Nanopartikel vergleichsweise gering sein [Westesen et al. 1997a]. Es sind allerdings auch recht hohe Einbauraten lipophiler Arzneistoffe (bis zu 10% bezogen auf die Lipidmatrix und für manche Stoffe wie beispielsweise Ubidecarenon auch höhere Konzentrationen) in feste Lipid-Nanopartikel beschrieben worden [Mehnert et al. 1997, zur Mühlen et al. 1998, Westesen et al. 1997]. Eine verzögerte Wirkstofffreisetzung konnte jedoch nicht generell erzielt werden. So zeigten beispielsweise tetracain- und etomidatbeladene (1-10% bezogen auf die Lipidmatrix Compritol), durch Schmelzhomogenisation hergestellte feste Lipid-Nanopartikel eine sehr rasche Wirkstofffreisetzung mit einem Ausstoß eines großen Anteils der Arzneistoffe nach Verdünnung der Systeme mit dem Freisetzungsmedium (burst-release-effect [zur Mühlen et al. 1998]). Im Gegensatz dazu erfolgte die Freisetzung von Prednisolon deutlich langsamer und ohne einen anfänglich raschen Austritt des Arzneistoffs aus den Lipid-Nanopartikeln. Es

sei jedoch angemerkt, dass Prednisolon nur mit einer deutlich geringeren Konzentration in die festen Lipidpartikel eingearbeitet werden konnte ($< 1\%$ bezogen auf die Lipidmatrices Compritol und Cholesterol). Weiterhin wurden diese Dispersionen durch Kalthomogenisation der festen Lösung des Arzneistoffs im Lipid hergestellt, was im Vergleich zur Schmelzhomogenisation zu Dispersionen mit größeren mittleren Partikeldurchmessern führen sollte [Mehnert und Mäder 2001]. Die Partikelgrößen der untersuchten kolloidalen Dispersionen waren in dieser Studie nicht angegeben [zur Mühlen et al. 1998]. Die unterschiedlichen Freisetzungsprofile wurden insbesondere auf eine unterschiedliche Verteilung der Arzneistoffe in der festen Lipidmatrix zurückgeführt. Bei den durch Schmelzhomogenisation hergestellten Nanopartikeln wird eine Anreicherung des Arzneistoffs in der Grenzschicht der Partikel aufgrund langsamer Kristallisation angenommen. Im Gegensatz dazu liegt der Arzneistoff nach Kalthomogenisation der schockgefrorenen Lösung des Arzneistoffs im Matrixlipid molekulardispers verteilt in der Lipid-Matrix vor. Allerdings wurde für Tetracain und Etomidat auch aus Lipid-Mikropartikeln, die durch Mahlen einer schockgefrorenen Lösung der Arzneistoffe im Lipid erhalten wurden, eine rasche Freisetzung beobachtet ($\geq 70\%$ innerhalb 60 min für Compritol-Mikropartikel $< 71 \mu\text{m}$).

2.1.3 Liposomen

Liposomen sind Vesikel aus Phospholipid-Doppelschichten, in denen eine wässrige Phase eingeschlossen ist. Je nach ihrer Größe und Anzahl der Doppelschichten werden kleine und große unilamellare (SUV: small unilamellar vesicles, LUV: large unilamellar vesicles), oligolamellare (OLV: oligolamellar vesicles) und multilamellare (MLV: multilamellar large vesicles) Liposomen unterschieden. Für die Herstellung können sowohl natürliche wie auch synthetische Phospholipide eingesetzt werden [Sharma und Sharma 1997, Barenholz 2001].

Für eine parenterale Applikation sind aufgrund ihrer geringen Partikelgröße insbesondere kleine unilamellare Liposomen geeignet. In Liposomen können hydrophile, amphiphile sowie auch lipophile Arzneistoffe inkorporiert werden. Hydrophile Arzneistoffe befinden sich hierbei in dem von den Phospholipid-Doppelschichten umschlossenen wässrigen Innenraum der Liposomen. Die Beladung der Liposomen kann beispielsweise über einen pH-Gradienten erfolgen, der zugleich einen schnellen Austritt der Arzneistoffe aus den Liposomen verhindern soll [Barenholz 2001]. Lipophile Arzneistoffe werden in die Lipid-Doppelschichten eingelagert. Die Aufnahmekapazität des Phospholipid-Bilayers für lipophile Moleküle ist allerdings begrenzt. Um eine längere Zirkulationszeit der Liposomen in vivo zu gewährleisten, erfolgt häufig eine zusätzliche sterische Stabilisierung durch PEGylierte

Phospholipide (LCL: long circulating liposomes [Sharma und Sharma 1997, Barenholz 2001]).

Trotz intensiver Forschung sind bisher nur wenige Liposomen-Präparate kommerziell erhältlich, wie beispielsweise für Doxorubicin (Doxil[®]), Daunorubicin (Daunoxome[®]) und Amphotericin B (Ambisome[®]), was insbesondere auf Stabilitätsprobleme zurückzuführen ist [Sharma und Sharma 1997]. Zur Erhöhung der Stabilität werden Liposomen-Dispersionen oft gefriergetrocknet.

Die Herstellung der Liposomen erfolgt meist mit Hilfe einer Lipid-Filmbildung, die die Lösung der Lipide in einem organischen Lösungsmittel voraussetzt. Nach Hydratisierung des Lipidfilms können durch Extrusion, Hochdruckhomogenisation oder auch durch Ultraschallbehandlung kleine unilamellare Liposomen erhalten werden. Die Extrusion führt im Vergleich zur Hochdruckhomogenisation zu Dispersionen mit engerer Partikelgrößenverteilung. Bei der Hochdruckhomogenisation wird eine große Anzahl sehr kleiner Vesikel gebildet, was bei Verwendung hochreiner Phospholipide aufgrund des hohen Krümmungsdrucks zu Instabilitäten führen kann [Lauf 2003, Lauf et al. 2004]. Neben der klassischen Filmbildungsmethode sind eine Reihe weiterer Herstellungsmethoden für Liposomen beschrieben [Torchilin und Weissig 2003].

Eine interessante neuere Entwicklung sind die sog. Liposomengele (vesicular phospholipid gels [Brandl et al. 1998, Brandl 2002]), die als Trägersystem für hydrophile Arzneistoffe wie beispielsweise Vincristinsulfat [Güthlein et al. 2002], 5-Fluorouracil [Kaiser et al. 2003] und Gemcitabin [Moog et al. 2002] untersucht werden. Die Gele können aus gereinigten Soja- oder Ei-Phospholipiden durch Hochdruckhomogenisation hergestellt werden. Die Phospholipide werden dabei in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt (30-60% m/m [Brandl 2002]), so dass die meist kleinen unilamellaren Phospholipid-Vesikel in enger Packung in den Gelen vorliegen [Brandl et al. 1997]. Aufgrund des günstigen Verhältnisses der wässrigen Phase außer- und innerhalb der Liposomen werden hohe Einschussraten der Arzneistoffe in den inneren Vesikelkern erreicht. Da eine Abtrennung des in der äußeren wässrigen Phase gelösten Arzneistoffs wegen der geringen Konzentration meist nicht notwendig ist, wird ein Konzentrationsgradient der Arzneistoffe vom Liposomenkern zur äußeren, wässrigen Phase vermieden, wodurch die hohe Einschusskapazität auch über den Lagerungszeitraum erhalten bleibt. Durch Verdünnung der Liposomengele lassen sich konventionelle Liposomen-Dispersionen mit meist kleinen, unilamellaren Liposomen und ausreichender Stabilität herstellen [Brandl et al. 1998].

2.1.4 Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und Emulsionen proteinfreier LDL-ähnlicher Partikel als Arzneistoffträgersysteme

Lipoproteine sind physiologische Transportsysteme für wasserunlösliche Lipide im Blut. Sie bestehen aus Lipiden und besonderen Proteinen, den Apolipoproteinen. In Abhängigkeit von ihrer Dichte werden vier Lipoprotein-Hauptklassen unterschieden (Tab. 2.1.1). Lipoproteine geringer Dichte (LDL – low density lipoproteins) sind für den Transport von in der Leber synthetisiertem Cholesterol zu den extrahepatischen Geweben verantwortlich und werden von den Zellen nach Bindung an spezifische LDL-Rezeptoren durch Endocytose aufgenommen. Für LDL ist Apolipoprotein B-100 charakteristisch, das eine Bindungsdomäne für den LDL-Rezeptor aufweist. Erhöhte LDL-Blutspiegel werden mit einem erhöhten Arteriosklerose-Risiko in Verbindung gebracht [Krauss und Burke 1982, Rudel et al. 1986, Roheim und Asztalos 1995]. Zahlreiche Untersuchungen wurden deshalb an isolierten humanen LDL [Deckelbaum et al. 1977, Atkinson et al. 1977, Kroon 1981, Kroon und Krieger 1981, Prassl et al. 1995] und auch anhand von proteinfreien Modellsystemen [Ginsburg et al. 1982, Reisinger und Atkinson 1990] durchgeführt, um die Struktur sowie die physikochemischen Eigenschaften aufzuklären. Isolierte, humane LDL zeigen eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Partikelgröße [Kuchinskiene und Carlson 1982, McKeone et al. 1993, van Antwerpen et al. 1999], wobei die einzelnen Unterklassen eine unterschiedliche klinische Relevanz aufweisen [Rudel et al. 1986, Berneis und Krauss 2002, Roheim und Asztalos 1995].

Tabelle 2.1.1: Physikalische Eigenschaften und chemische Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteinklassen [Löffler 2003].

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	0,93	0,93-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Durchmesser (nm)	75-1200	30-80	18-25	5-12
Zusammensetzung (m/m)				
Triglyceride (%)	86	55	6	4
Cholesterol und Cholesterolester (%)	5	19	50 ¹⁾	19
Phospholipide (%)	7	18	22	34
Apolipoproteine (%)	2	8	22	42

¹⁾ Ca. 7-10% freies Cholesterol und ca. 40-46 % Cholesterolester [Berneis und Krauss 2002].

Trotz intensiver Untersuchungen ist die Struktur der LDL-Partikel noch nicht vollständig geklärt. Im Allgemeinen wird eine annähernd sphärische Gestalt der LDL angenommen. Vereinfacht dargestellt bilden die hydrophoben Lipide (größtenteils Cholesterolester) den Lipid-Kern, der von einem Phospholipid-Monolayer umgeben ist. Jedes LDL-Partikel ist mit einem ApoB-100-Molekül assoziiert (Abb. 2.1.1 [Pregetter et al. 1999, Hevonoja et al. 2000]). LDL weisen in thermoanalytischen Untersuchungen einen Phasenübergang zwischen ca. 15 und 36 °C auf, der auf den flüssigkristallinen Phasenübergang der Cholesterolester zurückgeführt wird. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist der in Röntgenuntersuchungen bei Raum- oder tieferen Temperaturen beobachtete Röntgenkleinwinkelreflex bei ca. 36 Å. Cryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen, die bei Raum- bzw. tieferen Temperaturen durchgeführt wurden, weisen auf eine annähernd zylinderförmige Gestalt der LDL-Partikel unterhalb ihres isotrop-flüssigkristallinen Phasenübergangs hin [van Antwerpen und Gilky 1994, van Antwerpen et al. 1997 und 1999, Orlowa et al. 1999]. Allerdings ist in der Literatur auch ein Modell sphärischer LDL-Partikel unterhalb des isotrop-flüssigkristallinen Phasenübergangs beschrieben, wobei insbesondere bei höherem Gehalt an Triglyceriden (Cholesterolester-Triglycerid-Verhältnis < 7) eine

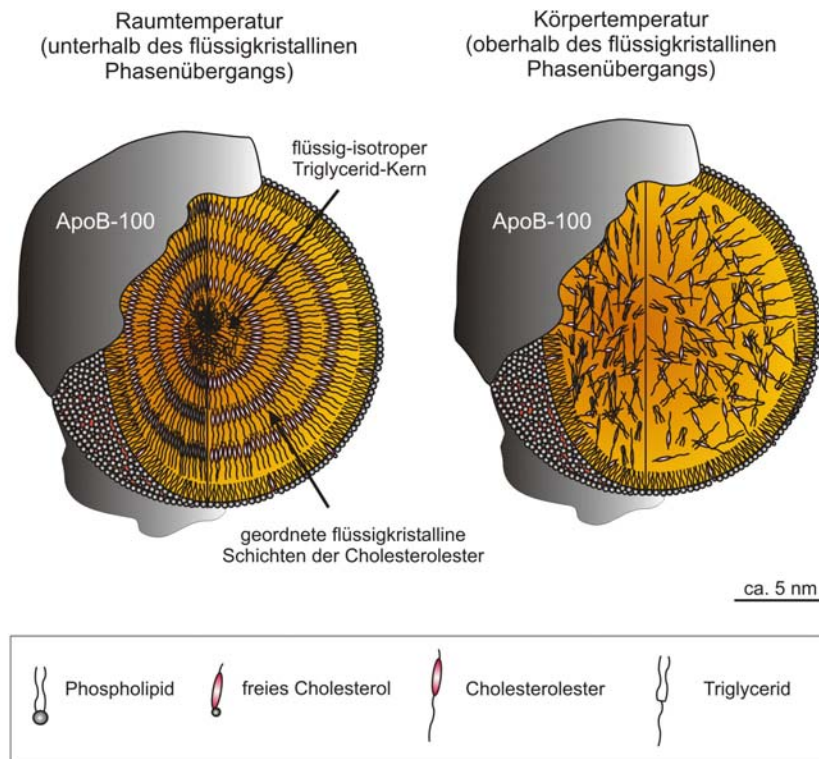


Abbildung 2.1.1: Vereinfachte schematische Darstellung der LDL-Struktur unterhalb (links) und oberhalb (rechts) des flüssigkristallinen Phasenübergangs der Cholesterolester (nach [Pregetter et al. 1999, Hevonoja et al. 2000]).

Phasenseparation im Lipid-Kern der LDL-Partikel angenommen wird (Abb. 2.1.1 [Pregetter et al. 1999, Hevonoja et al. 2000]). In einer Studie wird aufgrund von Berechnungsmodellen eine zylinderförmige Gestalt der LDL-Partikel sowohl oberhalb als auch unterhalb des flüssigkristallin-isotropen Phasenübergangs der Cholesterolester vorgeschlagen [Teerlink et al. 2004].

Viele Tumorgewebe weisen eine erhöhte Anzahl von LDL-Rezeptoren auf, da sie aufgrund des schnellen Tumorwachstums einen erhöhten Cholesterolbedarf zeigen. Isolierte humane LDL [Rudling et al. 1983, Masquelier et al. 1986, Lundberg 1987, Lundberg 1993, Westesen et al. 1995] sowie auch proteinfreie Model-LDL werden aufgrund dieser Tatsache als potentiell zielgerichtetes Transportsystem für antineoplastische Wirkstoffe untersucht [Firestone 1994, Rensen et al. 2001]. Die Verwendung von humanen LDL als Trägersystem für Arzneistoffe ist allerdings mit einigen Nachteilen verbunden, so dem hohen präparativen Aufwand für die Isolierung und Aufreinigung, dem potentiellen Infektionsrisiko sowie der nachträglichen Arzneistoffbeladung. Proteinfreie LDL-ähnliche Dispersionen enthalten meist Cholesteryloleat allein oder in Kombination mit Triolein und Cholesterol als Lipidmatrix, so dass der flüssigkristallin-isotrope Phasenübergang des Lipid-Kerns nahe der Körpertemperatur liegt [Ginsburg et al. 1982, Gerke et al. 1996]. Aufgrund der Ähnlichkeit der Zusammensetzung der Lipidmatrix (Cholesterolester) sind sie für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse.

Proteinfreie LDL-ähnliche Dispersionen können durch Ultraschall-Homogenisation [Ginsburg et al. 1982, Hungria et al. 2004], mittels eines Emulsions-Fällungsverfahrens [Gerke et al. 1996] sowie durch Extrusion [Owens und Halbert 1995] hergestellt werden. Hochdruckhomogenisation der geschmolzenen Lipide führt nicht zu einer der humanen LDL vergleichbaren mittleren Partikelgröße [Gerke et al. 1996, Owens und Halbert 1995]. Es liegen verschiedene in vitro- und in vivo-Studien zum Metabolismus und zur zytotoxischen Wirkung von proteinfreien, LDL-ähnlichen Emulsionen (sog. LDE) vor. Es wurde eine erhöhte Aufnahme der LDE-Partikel und auch von an die Emulsionspartikel gebundenen Arzneistoffen in verschiedene Tumorgewebe in Zellkulturmodellen [Dorlhac-Llacer et al. 2001, Maranhão et al. 2002] als auch bei der Anwendung bei Tumor-Patienten [Maranhão et al. 1994 und 2004, Ades et al. 2001] gezeigt. Die Formulierungen mit Daunorubicin [Dorlhac-Llacer et al. 2001] und Carmustin [Maranhão et al. 2002, Hungria et al. 2004] wiesen eine bessere Verträglichkeit bei gleichzeitiger Bewahrung ihrer zytotoxischen Wirkung im Vergleich zu den freien Wirkstoffen auf. Auch die LDE-Formulierungen mit Paclitaxel [Rodrigues et al. 2002] und Etoposidoleat [Valduga et al. 2003] waren im

Tiermodell deutlich besser verträglich als die kommerziellen Formulierungen. Etoposidoleat wurde als lipophileres Derivat aufgrund der geringen Affinität von Etoposid zu den LDE-Partikeln verwendet. In beiden Studien wurde jedoch eine geringere antineoplastische Wirksamkeit im Zellkulturmodell beobachtet, was auf die Zytotoxizität der Vehikel der kommerziellen Präparate zurückgeführt wird. So zeigten auch die LDE-Arzneistoffkomplexe nach Zugabe der jeweiligen Vehikel der kommerziellen Formulierungen eine den kommerziellen Formulierungen vergleichbare zytotoxische Wirkung. Die Herstellung dieser proteinfreien LDL-ähnlichen Emulsionen (LDE) erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ginsburg et al. [Ginsburg et al. 1982], bei der die Emulsionen in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung eine mittlere Partikelgröße von ca. 20 nm aufwiesen (Elektronenmikroskopie). Durch die Einarbeitung der Arzneistoffe kam es meist zu einer Zunahme der mittleren Partikelgröße, wobei allerdings die Messwerte in den Studien meist nicht aufgeführt sind. Für die mit Etoposidoleat beladene Emulsion wird eine mittlere Partikelgröße von bis zu 65 nm angegeben [Valduga et al. 2003].

2.2 Der thermotrop flüssigkristalline Zustand – ein kurzer Überblick

Im Jahre 1888 beobachtete Reinitzer Besonderheiten im Schmelzverhalten von Cholesterylbenzoat, wobei der Ester zunächst zu einer trüben Flüssigkeit schmolz, die bei höherer Temperatur völlig klar wurde. Der Begriff „fließende Kristalle“ wurde 1889 von Lehmann geprägt [Dörfler 2002]. Wie es der Begriff impliziert, ähneln die Eigenschaften der Flüssigkristalle sowohl denen eines kristallinen Festkörpers (Ordnungszustand der Moleküle) als auch denen einer Flüssigkeit (Mobilität der Moleküle auf molekularer Ebene). Da es sich bei dem flüssigkristallinen Zustand gewissermaßen um einen Zwischenzustand handelt, wird die Fähigkeit der Ausbildung von flüssigkristallinen Phasen auch Mesomorphie sowie der entsprechende Zustand Mesophase genannt.

Generell unterscheidet man zwischen lyotropen und thermotropen Flüssigkristallen. Thermotrope Mesophasen [Kelker und Hatz 1980, Kumar 2001, Madhusudana 2001] werden in Abhängigkeit von der Temperatur gebildet und setzen eine stark anisometrische Molekülgestalt des Mesogens voraus. Im Gegensatz dazu erfolgt die Ausbildung von lyotropen flüssigkristallinen Phasen in Abhängigkeit von der Konzentration des amphiphilen Mesogens in einem Lösungsmittel. Die Bildung lyotroper Mesophasen ist sowohl von der Konzentration des Mesogens als auch von der Temperatur abhängig. Manche Stoffe wie beispielsweise Phospholipide sind zur Ausbildung von thermotropen und lyotropen Mesophasen befähigt [Small 1986].

Thermotrop flüssigkristalline Phasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: in kalamitische (stäbchenförmige) und diskotische (scheibenförmige) Phasen. Langgestreckte, stäbchenförmige Moleküle sind zur Ausbildung thermotrop kalamitischer flüssigkristalliner Phasen befähigt. Neben Cholesterolestern [Ginsburg et al. 1984], bei denen zuerst thermotrope Mesophasen beobachtet wurden, sind heute eine Vielzahl weiterer thermotrop kalamitischer Mesogene bekannt [Kelker und Hatz 1980, Madhusudana 2001]. Kalamitische Mesophasen lassen sich grob in die smektische und die nematische Phase einteilen. Bildet eine Substanz sowohl eine smektische als auch eine nematische Phase, so ist die smektische Phase die bei tieferen Temperaturen existente flüssigkristalline Phase. In der smektischen Phase sind die Moleküle nahezu parallel zueinander ausgerichtet und in Schichten angeordnet (Abb. 2.2.1), wobei die Moleküle senkrecht (smektische A-Phase S_A) oder geneigt bezüglich der smektischen Schicht (smektische C-Phase S_C) vorliegen können. Es ist eine große Anzahl von Strukturmodifikationen der smektischen Phase beschrieben worden, wobei die Moleküle in den smektischen Schichten einen spezifischen Ordnungszustand aufweisen können. So sind beispielsweise in der smektischen B-Phase (S_B) die Moleküle in einem hexagonalen Gitter angeordnet [Dörfler 2002]. Cholesterolester bilden smektische A- bzw. C-Phasen ohne spezifischen Ordnungszustand der Moleküle in den Schichten [Ginsburg et al. 1984]. In der nematischen Phase sind die Moleküle noch annähernd parallel ihrer Moleküllängsachse zueinander ausgerichtet, jedoch nicht mehr in Schichten angeordnet (Abb. 2.2.1). Die cholesterische Phase kann als verdrehte nematische Phase aufgefasst werden. In dieser Phase sind die einzelnen nematischen Molekülschichten um einen bestimmten Winkel gegeneinander verdreht, so dass es zur Ausbildung einer helixartigen Struktur kommt (Abb. 2.2.1). Der Abstand zwischen den jeweils gleich ausgerichteten nematischen Molekülschichten wird als Ganghöhe bezeichnet (pitch). Die Ganghöhen der cholesterischen Phasen sind temperaturabhängig und liegen oft im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts, was zu charakteristischen Farbeffekten führt. Cholesterolester können smektische und cholesterische Mesophasen bilden.

Diskotisch flüssigkristalline Phasen, die erstmals 1977 von Chandrasekhar beschrieben wurden [Chandrasekhar und Ranganath 1990], können von Substanzen mit scheibenförmiger Gestalt gebildet werden. Solche Moleküle können sowohl diskotisch nematische (N_D) als auch Kolumnarphasen (D) ausbilden (Abb. 2.2.1). Eine neuere Substanzgruppe, die zur Ausbildung thermotroper Mesophasen befähigt ist, besitzt eine gekrümmte Molekülgestalt (sog. bananenförmige Moleküle [Pelzl et al. 1999]). Auch bestimmte Polymere können thermotrop und/oder lyotrop flüssigkristalline Phasen bilden (LCP – Liquid Crystalline

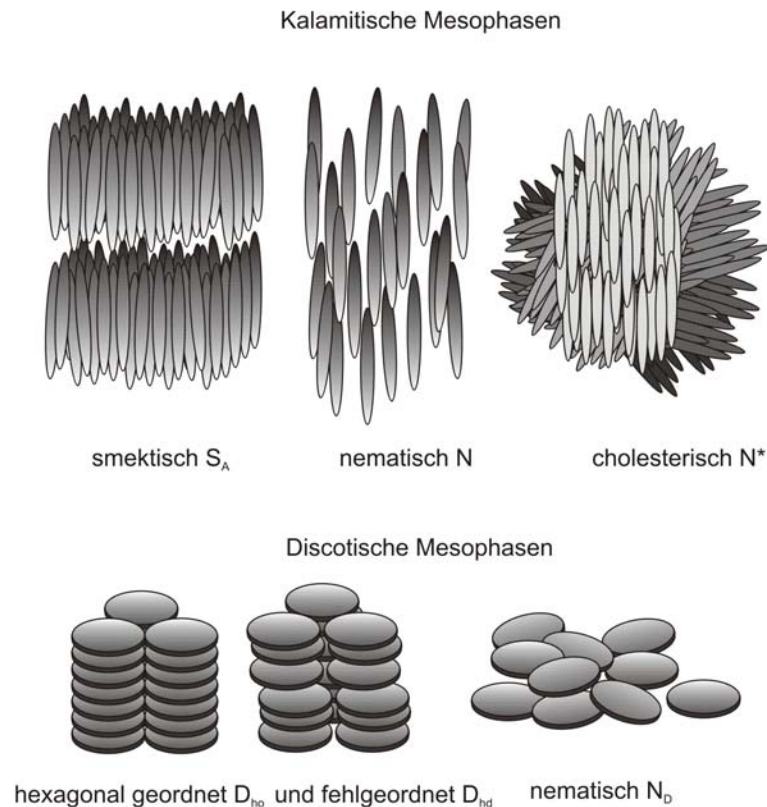


Abbildung 2.2.1: Schematische Darstellung der Struktur ausgewählter thermotroper Mesophasen.

Polymers). Es wurden sowohl thermotrop nematische als auch smektische Mesophasen gefunden [Dörfler 2002].

Die Nomenklatur der flüssigkristallinen Phasen ist nicht immer eindeutig. So werden aufgrund ähnlicher Eigenschaften (z.B. der polarisationsmikroskopischen Texturen) auch einige lyotrop flüssigkristalline Phasen als (lyotrop-)smektisch, (lyotrop-)cholesterisch oder (lyotrop-)nematisch bezeichnet [Kelker und Hatz 1980, Dörfler 2002]. In der vorliegenden Arbeit beziehen sich die Begriffe „smektisch“ und „cholesterisch“ immer auf thermotrop flüssigkristalline Zustände.

Für die Identifizierung sowie Charakterisierung thermotroper Mesophasen werden insbesondere polarisationsmikroskopische, thermoanalytische und Röntgenuntersuchungen durchgeführt [Kelker und Hatz 1980, Kumar 2001, Ginsburg et al. 1984]. Flüssigkristalline Phasen der gleichen Modifikation unterschiedlicher Stoffe sind miteinander mischbar, so dass die Identifizierung einer speziellen Modifikation (also beispielsweise einer speziellen smektischen Phase) polarisationsmikroskopisch durch Mischversuche der unbekannten Phase mit einer bekannten Mesophase vorgenommen werden kann [Dörfler 2002].

Thermotrop flüssigkristalline Phasen haben im technischen Bereich eine breite Anwendung gefunden, so vor allem in Form der Flüssigkristall-Anzeigen (LCD – Liquid Crystal Displays

[Madhusudana 2001, Dierking 2000]). Obwohl auch für Arzneistoffe thermotrope Mesomorphie beschrieben worden ist [Bunjes und Rades 2005, Stevenson et. al 2005], haben thermotrope Mesophasen im Bereich der Arzneiformung bisher keine große Bedeutung erlangt. In einigen Kosmetika werden cholesterische Mesophasen für die Erzielung besonderer Farbeffekte eingesetzt. Eine größere pharmazeutische Bedeutung haben lyotrop flüssigkristalline Phasen [Malmsten 2002, Müller-Goymann 2002]. Ein kolloidales Trägersystem, das auf einer dispergierten lyotrop flüssigkristallinen Phase beruht, sind sog. kubische Nanopartikel [Nakano et al. 2002, Siekmann et al. 2002].

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Matrixlipide - Cholesterolester

Die Bezugsquellen und die vom Hersteller angegebenen Reinheiten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cholesterolester sind in Tabelle 3.1.1 zusammengestellt. Die Struktur von Cholesterylmyristat ist in Abbildung 3.1.1 gezeigt.

Eine Charge Cholesterylmyristat (ICN, Lot. 6254E) wies einen eigenartigen Geruch auf und zeigte in den DSC- und polarisationsmikroskopischen Untersuchungen deutlich breitere und zu tieferen Temperaturen verschobene Phasenübergänge, was auf eine Verunreinigung der Substanz hinweist. Im Gegensatz dazu unterschied sich das Phasenverhalten kolloidaler Cholesterylmyristat-Dispersionen dieser Charge weniger von dem von Dispersionen gleicher Zusammensetzung, die unter ähnlichen Bedingungen, jedoch mit anderen Cholesterylmyristat-Chargen hergestellt wurden (s. A.2.1). Alle Dispersionen, die die vermutlich verunreinigte Charge enthalten, sind in der vorliegenden Arbeit mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Tabelle 3.1.1: Bezugsquelle und Reinheit (Angaben des Herstellers) der verwendeten Cholesterolester.

Cholesterolester	Hersteller	Reinheit
Cholesterylmyristat	Sigma Chemicals, USA	> 99%
	ICN Biomedicals, USA	> 99%
Cholesterylnonanoat	Acros Organics, USA	> 99%
Cholesterylpalmitat	Acros Organics, USA	> 95%
Cholesteryloleat	Acros Organics, USA	> 95%

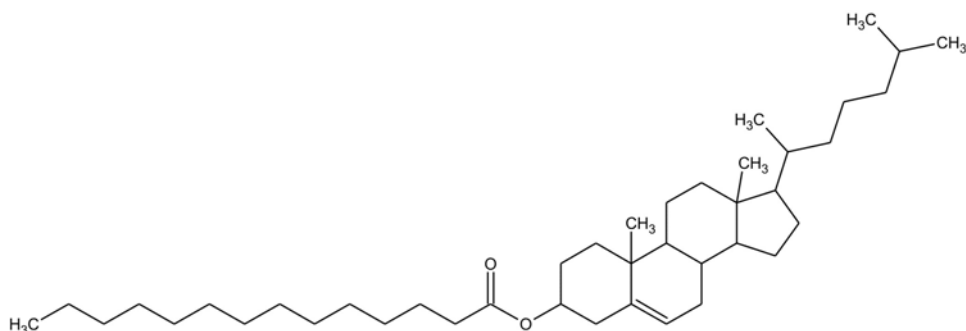


Abbildung 3.1.1: Struktur von Cholesterylmyristat.

3.1.2 Stabilisatoren

Phospholipide (Lecithin)

Phospholipide, die den Hauptbestandteil menschlicher und tierischer Membranen bilden, werden entsprechend ihrem Grundgerüst in Glycerophospholipide (Glycerolgrundgerüst) und Sphingoside (Ceramidgrundgerüst) eingeteilt [Small 1986]. Glycerophospholipide enthalten eine hydrophile Kopfgruppe wie z.B. Cholin, Ethanolamin oder Inositol, die über eine Phosphatgruppe mit dem Glycerolgrundgerüst verbunden ist. Die anderen beiden Hydroxylgruppen des Glycerols sind mit Fettsäuren verestert. Da Cholin und Ethanolamin bei physiologischem pH ein geladenes Stickstoffatom enthalten und die Phosphatgruppe eine negative Ladung trägt, weisen diese Phospholipide zwitterionischen Charakter auf. Phosphatidylinositol ist ein Beispiel für ein negativ geladenes Phospholipid. Die veresterten Fettsäureketten stellen den hydrophoben Teil der Moleküle dar.

Tabelle 3.1.2: Zusammensetzung der verwendeten Phospholipide (Herstellerangaben).

	Lipoid S75	Lipoid S100	Lipoid E80
<i>Phospholipide (g/100 g)</i>			
Phosphatidylcholin	68,0-73,0 (+ LPC)	min. 94,0	80,0-85,0 (+ LPC)
Phosphatidylethanolamin	7,0-10,0	max. 0,1	7,0-9,5
N-Acyl-Phosphatidylethanolamin		max. 0,5	
Phosphatidylinositol		max. 0,1	
Lysophosphatidylcholin (LPC)	max. 3,0	max. 3,0	max. 3,0
Lysophosphatidylethanolamin			max. 0,5
Sphingomyelin			2,0-3,0
<i>Unpolare Lipide (g/100 g)</i>		max. 3,0	
Triglyceride	max. 3,0	max. 2,0	max. 3,0
Cholesterol			max. 1,0
Freie Fettsäuren	max. 0,5	max. 0,5	max. 0,05
DL- α -Tocopherol	0,1-0,2	0,15-0,25	0,05-0,1
<i>Typische Fettsäurezusammensetzung (% der Gesamtfettsäuren)</i>			
Palmitinsäure	17-20	12-17	28-34
Stearinsäure	2-5	2-5	12-15
Ölsäure	8-12	11-15	26-30
Linolsäure	58-65	59-70	13-18
Linolensäure	4-6	3-7	max. 1,0
mehrfach ungesättigte Fettsäuren ($\geq C_{20}$)			6-10

Im Gegensatz zu synthetischen Phospholipiden, die eine definierte Fettsäurezusammensetzung aufweisen, ist die Fettsäurezusammensetzung natürlich vorkommender Phospholipide komplex und abhängig von ihrer Herkunft [Paltauf und Hermetter 1990]. Lecithin ist ein Gemisch natürlicher Phospholipide tierischer (Ei) oder pflanzlicher Herkunft (Soja) mit einem hohen Phosphatidylcholinanteil. Ei- und Soja-Lecithin sind in unterschiedlichen Qualitäten kommerziell erhältlich. Hochgereinigtes Ei-Lecithin wird für die Stabilisierung kolloidaler Fettemulsionen für die parenterale Ernährung verwendet [Davis 1990]. In der vorliegenden Arbeit wurden hochgereinigte Soja- (Lipoid S75 und Lipoid S100) und Ei-Phospholipide (Lipoid E80) eingesetzt (Lipoid, D-Ludwigshafen, Tab. 3.1.2).

Natriumglycocholat

Natriumglycocholat (Sigma Chemicals, USA-St. Louis, Reinheit ca. 99%) ist ein natürlich vorkommender Emulgator aus der Gruppe der Gallensalze, die physiologisch beispielsweise der Solubilisierung und Emulgierung der Nahrungsfette dienen. Gallensalze bestehen aus einem rigiden Steroidringsystem mit bis zu drei Hydroxylgruppen und einer Alkylkette, die an ihrem Ende eine Carboxylgruppe trägt. Die Alkylkette kann mit Glycin oder Taurin konjugiert sein. Aufgrund ihrer Struktur zeigen Gallensalze Besonderheiten in der Mizellbildung, wobei ein zweistufiger Aggregationsprozess diskutiert wird [Gouin und Zhu 1998]. Vor allem die Anzahl und die Stellung der OH-Gruppen beeinflussen die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) [Wiedmann und Kamel 2002]. Natriumglycocholat, das drei OH-Gruppen trägt, weist neben Natriumcholat die höchste CMC dieser Gruppe auf und besitzt eine vergleichsweise hohe Monomerenlöslichkeit.

Natriumoleat

Natriumoleat (Riedel-de Haën, D-Seelze, Reinheit 90%) ist ein anionisches Tensid mit einem HLB-Wert von 18 [Handbook of Pharmaceutical Excipients 1994]. Viele kolloidale Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung enthalten Natriumoleat zur pH-Einstellung (ClinOleic[®], Lipofundin[®], Lipovenös[®] [Rote Liste 2003]). Aufgrund seiner grenzflächenaktiven Eigenschaften sollte Natriumoleat jedoch auch zur Stabilisierung dieser kolloidalen Emulsionen beitragen [Washington und Davis 1987].

Tween 80

Tween 80 (Polysorbat 80, Serva Feinbiochemica, D-Heidelberg, rein, MG ~ 1300) mit einem HLB-Wert von 15 ist ein Gemisch von Partialestern des Sorbitans mit verschiedenen

Fettsäuren, copolymerisiert mit Ethylenoxid. Die Fettsäurefraktion kann pflanzlicher oder tierischer Herkunft sein und besteht zu einem großen Teil aus Ölsäure [Ph.Eur.].

Poloxamer

Die nichtionischen Poloxamere sind Block-Copolymere aus Ethylenoxid und Propylenoxid. Die einzelnen Poloxamertypen unterscheiden sich hinsichtlich des Polymerisationsgrades und des Verhältnisses von Ethylenoxid- und Propylenoxideinheiten. Für die Stabilisierung der Dispersionen wurde Poloxamer 188 (Lutrol F68, BASF, D-Ludwigshafen) mit einem mittleren Molekulargewicht von 8400 und einem Ethylenoxid-Anteil von $81,8 \pm 1,9\%$ (m/m, Herstellerangabe) eingesetzt. Die 1-10%igen wässrigen Lösungen weisen einen Trübungspunkt $> 100\text{ °C}$ auf. Der HLB-Wert von Poloxamer 188 ist mit > 24 angegeben (Herstellerangabe).

Poloxamin

Tetronic 908 (BASF, D-Ludwigshafen, MG ~ 25000) ist ein nichtionisches tetrafunktionales Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Block-Copolymer, wobei die vier Polymerketten über Ethylendiamin gebunden sind. Der Trübungspunkt der 1-10%igen wässrigen Lösung ist mit $> 100\text{ °C}$ und der HLB-Wert mit > 24 angegeben (Herstellerangabe).

Polyvinylalkohol (PVA)

Polyvinylalkohole werden durch Polymerisation von Vinylacetat und anschließender Hydrolyse gewonnen. Neben vollhydrolysierten sind teilhydrolysierte Polyvinylalkohol-Typen erhältlich, die im Vergleich zu den vollhydrolysierten Typen bei gleichem Polymerisationsgrad eine stärkere Erniedrigung der Oberflächenspannung hervorrufen und eine niedrigere Viskosität der wässrigen Lösung aufweisen. Aus diesem Grund werden vorzugsweise teilhydrolysierte Typen als Emulgatoren bzw. Schutzkolloide eingesetzt. Das verwendete Mowiol 3-83 (Clariant, D-Frankfurt/Main) ist ein teilhydrolysiertes Produkt mit einem Hydrolysegrad von ca. 83 Mol% und einem mittleren Molekulargewicht von 14000. Die Viskosität einer 4%igen wässrigen Lösung bei 20 °C wird mit $3\text{ mPa}\cdot\text{s}$ angegeben [Mowiol® Produktbroschüre 1991].

Saccharoseester

Saccharoseester sind nichtionische Tenside. In Abhängigkeit von der Anzahl der veresterten OH-Gruppen der Saccharose weisen sie HLB-Werte zwischen 1 und 16 auf. Sie haben vor allem in der Lebensmitteltechnologie breite Anwendung gefunden [Ryoto Sugar Esters®]

Produktbroschüre 2001] und werden auch für pharmazeutische Formulierungen diskutiert. Sie weisen jedoch eine vergleichsweise hohe hämolytische Aktivität auf [Söderlind et al. 2003]. Der verwendete Ryoto Sugar Ester L-1695 (Mitsubishi-Kagaku Foods, Japan-Tokio) mit einem HLB-Wert von 16 enthält ca. 80% Monoester und ca. 20% Di- und Triester der Saccharose, 1,7% freien Zucker und 0,8% freie Fettsäuren (Herstellerangaben). Dominierende Fettsäure ist die Laurinsäure (ca. 95%).

Gelatine und Gelatinepolysuccinat

Es wurde Pulvergelatine Typ A (Naumann Gelatine und Leim, D-Memmingen, 121 Bloomgram) und Gelatinepolysuccinat (Gelafundin 4% Infusionslösung, B. Braun-Melsungen, D-Melsungen) eingesetzt.

Natriumcaseinat

Casein ist ein in der Milch vorkommendes Protein, das mit Calciumphosphat größere Aggregate von ca. 200 nm bildet, die als Caseinmizellen bezeichnet werden [Dickinson 1998]. Das vorzugsweise in der Lebensmitteltechnologie gebräuchliche Natriumcaseinat wird durch Entfernen der Calcium-Ionen im Austausch gegen Natrium-Ionen gewonnen. Natriumcaseinat bildet in wässriger Lösung kleinere Caseinaggregate, sog. „Sub-Mizellen“ [Dickinson 1998, Lucey et al. 2000].

3.1.3 Arzneistoffe

Als Modellarzneistoffe wurden Ibuprofen (Synopharm, D-Barsbüttel), Etomidat (Arzneimittelwerk Dresden, D-Radebeul), Miconazol (Abic, Il-Natanya) und Progesteron (Jenapharm, D-Jena) eingesetzt. Die Strukturen der verwendeten Arzneistoffe sind in Abbildung 3.1.2 sowie die Eigenschaften in Tabelle 3.1.3 dargestellt.

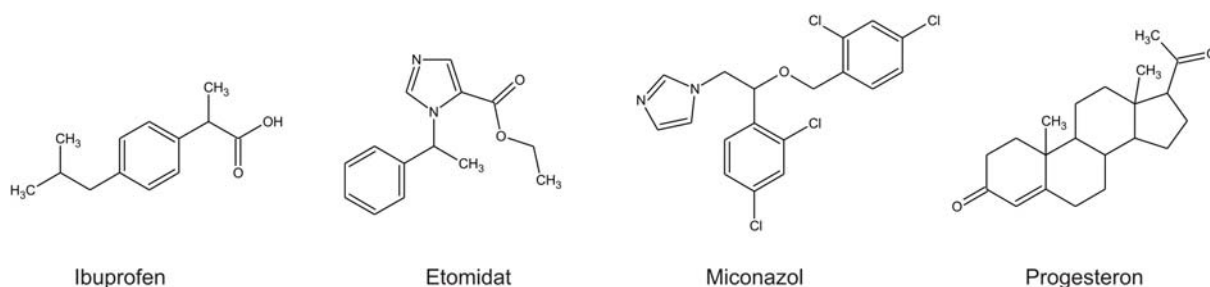


Abbildung 3.1.2: Strukturen der verwendeten Arzneistoffe.

Tabelle 3.1.3: Indikation und Eigenschaften der verwendeten Arzneistoffe [Pharmazeutische Stoffliste 1999].

Arzneistoff	Schmelzpunkt (°C)	pK _A	Indikationsgebiet
Ibuprofen	75-77	4,4 und 5,2	Analgetikum, Antirheumatikum
Etomidat	67	4,2	Kurznarkotikum
Miconazol	83-87 ¹⁾	6,7	Antimykotikum
Progesteron	127-131 (α -Form) 121 (β -Form)		Hormontherapie

¹⁾ Angabe nach Ph.Eur., da keine Angabe in der Pharmazeutischen Stoffliste.

3.1.4 Wasseraufbereitung

Für die Herstellung der Dispersionen wurde Wasser für Injektionszwecke (Ph.Eur.) verwendet, das in der lehrstuhleigenen Reinstwasseranlage gewonnen wurde (Abb. 3.1.3). Die Herstellung des Reinstwassers erfolgt durch Ionenaustausch, Umkehrosmose und anschließender Destillation aus Trinkwasser. Leitfähigkeit, Wasserhärte sowie Temperaturen und Füllstände in den Lagertanks werden permanent überwacht. Monatlich erfolgt die Prüfung der Wasserqualität nach den Vorschriften des Ph.Eur. (mikrobiologische Untersuchung, pH-Wert, Leitfähigkeit, Wasserhärte). Halbjährlich wird die gesamte Anlage sterilisiert (134 °C, 3 bar).

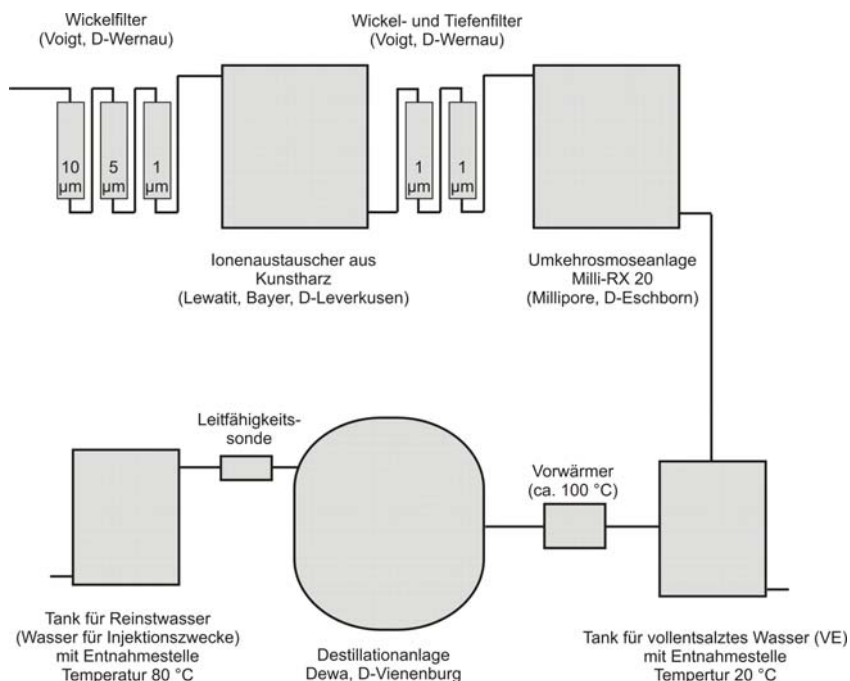


Abbildung 3.1.3: Schema der lehrstuhleigenen Reinstwasseranlage.

Für die Analytik (Partikelgrößenmessungen, HPLC usw.) wurde entmineralisiertes Wasser der Reinstwasseranlage bzw. aus einem Alpha-Q Ultra-Pure Water System (Millipore, D-Eschborn) verwendet.

3.1.5 Sonstige Stoffe

In Tabelle 3.1.4 sind alle sonstigen verwendeten Stoffe aufgelistet. Die Spezifikationen und Bezugsquellen spezieller Materialien für die Zellkultur, wie z.B. Medien, Puffer sind im Methodenteil (3.2.14 Zellkultur) aufgeführt.

Tabelle 3.1.4: Übersicht über sonstige verwendete Materialien.

Material	Hersteller	Reinheit
1-Propanol	Merck, D-Darmstadt	$\geq 99,8\%$
Acetonitril	Roth, D-Karlsruhe	Rotisol [®] , $> 99,9\%$
Chloroform	Fluka, CH-Buchs	$\geq 99,8\%$
Cyclohexan	Ferak Laborat, D-Berlin	$> 99,5\%$
Diethylether	Merck, D-Darmstadt	$\geq 99,5\%$
Dinatriumhydrogenphosphat *2 H ₂ O	Merck, D-Darmstadt	$> 99,5\%$
DMSO	Sigma, D-Taufkirchen	$\geq 99,9\%$
Essigsäure (wasserfrei)	Merck, D-Darmstadt	99,9%
Essigsäuremethylether	Merck-Suchardt, D-Hohenbrunn	$\geq 99\%$
Glycerol	Solvay, D-Rheinberg	99,5%
Kaliumchlorid	Roth, D-Karlsruhe	$> 99,5\%$
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, D-Darmstadt	98-101%
Kupfersulfat * 5 H ₂ O	Merck, D-Darmstadt	$> 99\%$
Methanol	Roth, D-Karlsruhe	Rotisol [®] , $> 99,9\%$
Natriumchlorid	AppliChem, D-Darmstadt	99,0-100,5%
n-Hexan	Roth, D-Karlsruhe	$> 98\%$
Phosphorsäure 85%	Merck, D-Darmstadt	85%
Sojaöl	Croda Universal, UK-Humberside	k.A.
Sulforhodamin B (Na-Salz)	Fluka, CH-Buchs	ca. 95%
Tetrahydrofuran	Roth, D-Karlsruhe	Rotisol [®] , $> 99,9\%$
Thiomersal	Caesar & Loretz, D-Hilden	DAC-Qualität
Trichloressigsäure	Merck, D-Darmstadt	99-100%
Tris-Base	Sigma, D-Taufkirchen	Reagent Grade
Trilaurat (Dynasan 112)	Condea Chemie, D-Witten	k.A.
Lipofundin [®] MCT	BBraun Melsungen, D-Melsungen	

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Dispersionen

Die Herstellung der Dispersionen erfolgte entweder durch Hochdruckhomogenisation der geschmolzenen Lipide in einer heißen wässrigen Phase (Schmelzhomogenisation) oder durch Hochdruckhomogenisation einer Lösung des Lipids in einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel mit der wässrigen Phase bei Raumtemperatur bzw. unter leichter Kühlung und anschließender Entfernung des organischen Lösungsmittels (Emulsions-Fällungsverfahren). Für die Hochdruckhomogenisation wurden zwei verschiedene Hochdruckhomogenisatoren verwendet, deren Arbeitsweise im Folgenden kurz dargestellt werden soll.

Beim Microfluidizer M110S (Microfluidics, USA-Newton) wird die Rohemulsion mit hohem Druck in eine Interaktionskammer geleitet, wo sie in Mikrokanäle definierter Geometrie aufgespalten, auf hohe Geschwindigkeiten beschleunigt und wieder zu einem Strahl zusammengeführt wird. Vor allem beim Aufeinanderprallen der Produktströme kommt es durch Scher-, Turbulenz- und Kavitationskräfte zur Partikelzerkleinerung [Naini und Singh 2002, Scott und Tabibi 1998]. Die Homogenisation kann sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich erfolgen. Die Temperierung des Homogenisators erfolgte durch Vorlaufenlassen mit erwärmten gereinigten Wasser bei hohen Drücken (900-1000 bar) und durch Temperierung der Interaktionskammer sowie der nachfolgenden Kühlschleife in einem Wasserbad. Die Temperatur wurde mit einem Flüssigkeitsthermometer im Vorratsgefäß des Microfluidizers gemessen. Die Einstellung des Homogenisationsdrucks erfolgte durch Regulierung des Vordrucks und konnte während der Homogenisation mittels eines Druckmessers direkt vor der Interaktionskammer verfolgt werden. Nachteilig ist die Verdünnung des Produkts durch im Leitungssystem des Microfluidizers zurückbleibende Flüssigkeit.

Der Micron-Lab 40 (APV-Gaulin, D-Lübeck) arbeitet nach dem Kolben-Spalt-Prinzip [Naini und Singh 2002, Jahnke 1998]. Die Rohemulsion wird mit hohem Druck durch einen engen Ringspalt gedrückt, wodurch starke Scher- und Kavitationskräfte auftreten. Nachteilig ist, dass die Homogenisation nur diskontinuierlich erfolgen kann. Da der Homogenisator nicht mit einem Temperiermantel ausgestattet war, erfolgte die Temperierung des Homogenisators ausschließlich durch Erwärmen der produktberührenden kompakten Edelstahlteile des Homogenisators im Heißluftschrank auf 90-100 °C. Eine Abkühlung während des Homogenisationsprozesses, vor allem bei der Homogenisation in mehreren Zyklen, ist nicht

auszuschließen. Die Einstellung des Homogenisierdrucks erfolgte durch Voreinstellung des gewünschten Drucks.

In der Regel wurden Dispersionen mit 5% Cholesterolester und 1-5% verschiedener Stabilisatoren hergestellt (bezogen auf den Herstellungsansatz, m/m). Mit Ausnahme der Dispersionen für die Zytotoxizitätsuntersuchungen, die nicht konserviert wurden, wurden alle Dispersionen mit einer wässrigen Phase hergestellt, die 2,25% Glycerol zur Isotonisierung und 0,01% Thiomersal zur Konservierung enthielt (m/m). Die pH-Werte sowie die Osmolalitäten der unterschiedlichen wässrigen Phasen lagen zwischen pH 6 und 7 bzw. zwischen 240 und 260 mOsmol/kg. Eine Übersicht über die Zusammensetzung, Herstellungsbedingungen und Partikelgrößen der hergestellten Dispersionen findet sich im Anhang A.1. Wenn nicht anders angegeben, sind alle Prozentangaben m/m-Prozente und beziehen sich auf die Gesamtdispersion im Herstellungsansatz.

Die Dispersionen wurden nach der Herstellung in einem Klimaschrank bei 23 °C gelagert (Kennzeichnung RT). Jeweils ein kleiner Teil der Dispersionen wurde zu Vergleichszwecken im Kühlschrank (4 °C) gelagert (Kennzeichnung KS). Wenn im Text nicht anders vermerkt, handelt es sich immer um Angaben zu dem bei 23 °C gelagerten Teil der Dispersionen.

Schmelzhomogenisierung

Die Lipidphase wurde auf Temperaturen von ca. 10 °C über dem Schmelzpunkt des Lipids (isotrope Schmelze) erwärmt. Die hydrophilen Stabilisatoren wurden in der wässrigen Phase gelöst bzw. dispergiert. Die Phospholipide wurden, wenn nicht anders angegeben, für mindestens 24 Stunden in der wässrigen Phase bei Raumtemperatur dispergiert. Die stabilisatorhaltige wässrige Phase wurde auf die gleiche Temperatur wie die Lipidschmelze erwärmt und beide Phasen mit einem Ultra-Turrax T8 (Janke & Kunkel, Ika Labortechnik, D-Staufen) mit der höchsten Umdrehungszahl (ca. 25000 min⁻¹) für 1-10 Minuten bei der gleichen Temperatur vordispergiert und die so erhaltene Rohdispersion in den temperierten Hochdruckhomogenisator überführt. Die Homogenisation erfolgte bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt des Lipids entweder kontinuierlich für 3-7 Minuten mit Drücken zwischen 650-1300 bar (Microfluidizer) oder diskontinuierlich mit 5-10 Zyklen mit Drücken von 1300-1600 bar (Micron-Lab 40). Die so erhaltenen Dispersionen wurden, wenn möglich, durch einen 0,2 bzw. 5 µm Membranfilter (Braun-Melsungen, D-Melsungen) filtriert und in Vials abgefüllt.

Emulsions-Fällungsverfahren

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Sjöström und Bergenstahl [Sjöström et al. 1993a]. Das Lipid und das Phospholipid wurden in Cyclohexan sowie die hydrophilen Stabilisatoren (Natriumglycocholat, Poloxamer) in der wässrigen Phase gelöst. Beide Phasen wurden mit einem Ultra-Turrax T8 (Janke & Kunkel, Ika Labortechnik, D-Staufen) mit der höchsten Umdrehungszahl (ca. 25000 min^{-1}) für 3-10 Minuten bei Raumtemperatur vordispersiert. Die so erhaltene Rohdispersion wurde in den Microfluidizer überführt und kontinuierlich für 5 Minuten unter Kühlung der Interaktionskammer mit Eiswasser mit Drücken von 400 bis 1000 bar homogenisiert. Das organische Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck (200 mbar) bei leicht erhöhten Temperaturen (30-35 °C) in einer Rotationsvakuumanlage (Rotavapor R-114, Vacobox B-177, Wasserbad B-481, Büchi Labortechnik, D-Konstanz) abgedampft. Die sehr feinen, durchscheinenden Dispersionen wurden durch einen 0,2 bzw. 5 µm Membranfilter (Braun-Melsungen, D-Melsungen) filtriert, in Vials abgefüllt und dann im Wasserbad für 10 min bzw. im Heißluftschrank für 30 min auf 95 °C erwärmt, um alle Partikel in den smektischen Zustand zu überführen.

Einarbeitung von Arzneistoffen in die Dispersionen

Die Arzneistoffe wurden durch gemeinsames Aufschmelzen mit dem Matrixlipid in die Dispersionen eingearbeitet. Die arzneistoffhaltigen Lipidphasen wurden dann mit der wässrigen Phase wie im Abschnitt „Schmelzhomogenisierung“ beschrieben mit dem Microfluidizer homogenisiert.

Eine ibuprofenbeladene Dispersion wurde mit dem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellt. Der Arzneistoff und das Cholesterylmyristat wurden in Cyclohexan gelöst und die Dispersion wie im Abschnitt „Emulsions-Fällungsverfahren“ beschrieben hergestellt.

3.2.2 Autoklavieren ausgewählter Dispersionen

Einige ausgewählte Dispersionen wurden nach der Herstellung in einem Industrieautoklaven mit automatischer Regelung (Thema 3, Fedegari Autoclavi, I-Albuzzano) im Dampf-Luft-Gemisch-Verfahren (DLGV-DLK, [DIN 58 950 Teil1 und 6]) autoklaviert. Die Temperaturkontrolle erfolgte mit Pt-100-Messfühlern, die an unterschiedlichen Stellen im Autoklaven-Innenraum lokalisiert wurden. Ein Temperaturfühler befand sich in einem offenen, mit Wasser für Injektionszwecke gefüllten Referenzvial (gleiche Größe und gleiches Füllvolumen). Der Druck- und Temperaturverlauf während des Autoklavierens der Dispersionen

C und E (5% Cholesterylmyristat, 3,2% Lipoid S100, 0,8% Natriumglycocholat) ist in Abbildung 3.2.1 gezeigt.

3.2.3 Ultrazentrifugation

Zur Abtrennung einzelner Fraktionen größerer Partikel wurden zwei Dispersionen (H_RT und M1_RT; 5% Cholesterylmyristat, 3,2% Lipoid S100, 0,8% Natriumglycocholat) in einer Optima XL 80-Ultrazentrifuge mit dem Ausschwingrotor SW 55 Ti (Beckman, D-München) zentrifugiert. Circa 4,5 g

Dispersion wurden in Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff (Polyallomer bzw. Ultra Clear 5 ml, Beckman, D-München) eingewogen und mit 10000 bzw. 20000 Umdrehungen je Minute (entsprechend 9500 bzw. 37900 x g) bei 23 °C unterschiedlich lange zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen durch Schneiden der Zentrifugenröhrchen gewonnen.

3.2.4 Partikelgrößenanalyse

Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Messungen erfolgten mit dem Zeta Plus-Messgerät (Brookhaven Instr.) unter einem festen Detektionswinkel von 90 ° bei 25 °C. Die Proben wurden bis zu einer Zählrate von ca. 100000 mit entmineralisiertem Wasser verdünnt. Das Wasser wurde zuvor durch einen 0,2 µm Membranfilter (Sterifix, Braun-Melsungen, D-Melsungen) filtriert. Es wurden jeweils 5-8 Messungen über 5 Minuten durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die Berechnung und Auswertung erfolgte mit der Zeta Plus Particle Sizing Software Version 2.18 (Brookhaven Instr.) unter Annahme einer Viskosität des Dispersionsmittels von 0,890 mPa*s, und Brechungsindices von 1,330 (Dispersionsmedium) bzw. 1,460 (Partikel).

Bei der PCS werden zeitabhängig die Intensitäts-Schwankungen des an den Teilchen gestreuten Laserlichts in der Regel in einem Detektionswinkel von 90 ° gemessen. Diese Streulicht-Fluktuationen sind auf eine der Brownschen Bewegung ähnlichen Bewegung der kolloidalen Teilchen im Dispersionsmedium, die größenabhängig ist, zurückzuführen. Somit wird der Diffusionskoeffizient der Partikel in dem Medium erhalten, aus dem unter Annahme

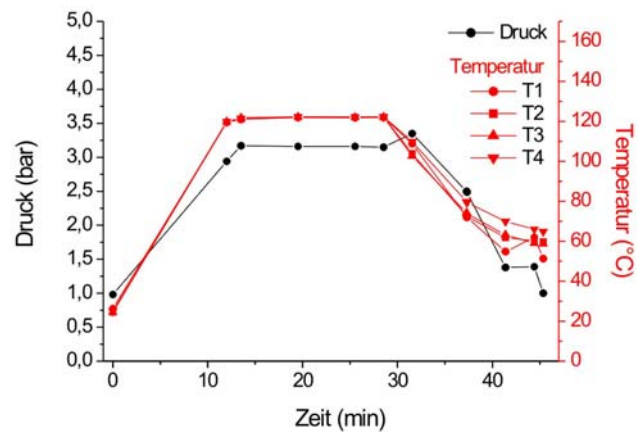


Abbildung 3.2.1: Temperatur- und Druckverlauf während des Autoklavierens von zwei Dispersionen. Der Temperaturfühler T4 befand sich in einem mit Wasser gefüllten Referenzvial. Die Temperaturfühler T1-T3 waren an unterschiedlichen Stellen im Autoklaven platziert.

einer sphärischen Gestalt der Durchmesser der Partikel errechnet werden kann (Stokes-Einstein-Gleichung):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

D	Diffusionskoeffizient
k	Boltzmann-Konstante
T	Temperatur
η	Viskosität des Mediums
d	Partikeldurchmesser

Da die Partikelgrößenbestimmung auf einem Lichtstreuverfahren beruht, sind weiterhin die optischen Eigenschaften sowohl der Partikel als auch des Dispersionsmediums von Bedeutung.

Bei der Auswertung nach der Kumulantenmethode wird ein intensitätsgewichteter hydrodynamischer mittlerer Durchmesser (z-average) und ein Wert für die Breite der Partikelgrößenverteilung (Polydispersitätsindex PI) erhalten [Finsy 1994, Müller und Schuhmann 1996, Washington 1992].

Laserdiffraktometrie mit PIDS-Technologie

Die Messungen wurden mit einem LS 230 Particle Sizer (Small Volume Module, Beckman-Coulter Instr.) durchgeführt. Die Kombination der Laserdiffraktometrie mit der speziellen PIDS-Technologie erlaubt die Messung von Partikeln im Größenbereich von 40 nm bis 2000 μm . Der Aufbau des verwendeten Messgerätes ist in Abbildung 3.2.2 schematisch dargestellt. Im PIDS-Messverfahren wird die Probe mit linear polarisiertem Licht unterschiedlicher Wellenlängen bestrahlt und die Lichtstreuung unter mehreren Winkeln gemessen. Die PIDS-Technologie nutzt für die Partikelgrößenbestimmung die Änderung der Polarisationssebene des Lichts.

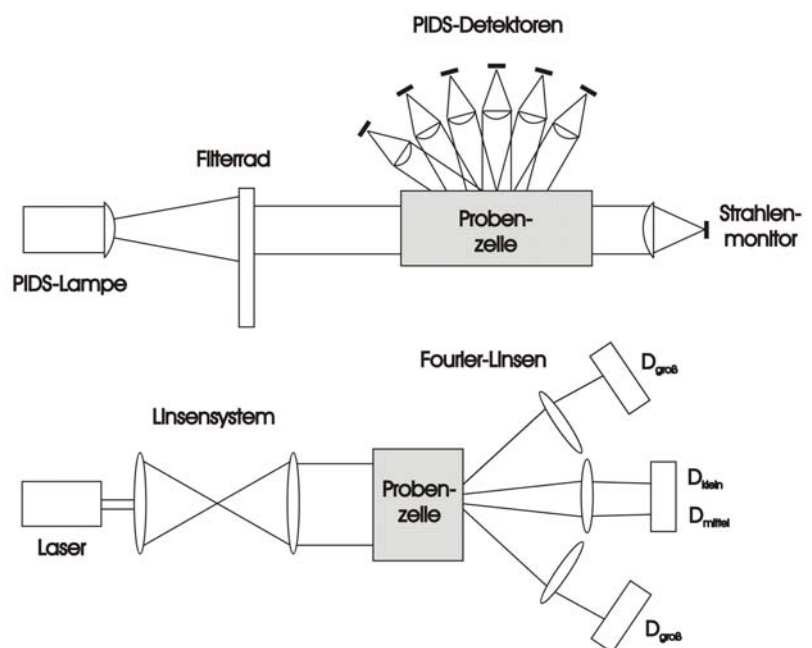


Abbildung 3.2.2: Schematischer Aufbau des Coulter-LS 230, nach [Müller und Schuhmann 1996].

tes, die vor allem bei Partikeln im nm-Bereich charakteristisch ist. Mit diesem Messverfahren, bei dem eine Volumenverteilung erhalten wird, können somit auch sehr breit verteilte Proben charakterisiert werden [Xu 1997, Müller und Schuhmann 1996].

Die verschiedenen, in einem Messgerät vereinten Messverfahren bedingen, dass die Beladungskapazität nur bei sehr breit verteilten Proben, die eine ausreichende Anzahl Partikel sowohl im nm- als auch im μm -Bereich aufweisen, für beide Messverfahren optimal ist. Da die Partikelgrößenverteilung der Dispersionen der vorliegenden Arbeit in der Regel im Bereich zwischen 40 bis 600 nm lag, wurde für die Messungen eine optimale optische Konzentration für den PIDS-Messbereich gewählt. Die Berechnung der Partikelgrößenverteilung erfolgte unter Zugrundelegen der Mie-Theorie mit einem geschätzten Brechungsindex von 1,45 und der Annahme einer sphärischen Gestalt der Partikel. Für die Messung wurden die Proben mit entmineralisiertem Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 6-8 Messungen über 90 Sekunden durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt.

Aus der volumenbezogenen Verteilung können verschiedene Durchmesserangaben erhalten werden: z.B. Mode (Maximum der Verteilung), Median (D50), Mean (arithmetischer Mittelwert der Verteilung) und D99 (Durchmesser bei 99% der Durchgangssumme).

3.2.5 Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential der Dispersionen wurde mit einem Zetasizer ZS (Malvern Instr.) bei 25 °C gemessen. Die Dispersionen wurden hierzu mit sterilfiltriertem TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4) verdünnt und in speziellen Küvetten (DTS 1060 – Disposable Zeta Cell, Malvern Instr.) vermessen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der DTS Dispersion Technology Software (Version 3.30 2002, Malvern Instr.) mit dem Smoluchowski-Modell. Für das Dispersionsmedium wurden folgende Werte zugrunde gelegt: Viskosität 0,8872 mPa*s, Brechungsindex 1,330 und dielektrische Konstante 79. Es wurden jeweils 4 Messungen mit je 30 Einzelmessungen durchgeführt.

3.2.6 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Pyris 1 (Perkin-Elmer)

Die Proben wurden in kaltverschweißten Standard-Aluminiumtiegel (Perkin-Elmer) gegen einen leeren Referenztiegel unter Stickstoffatmosphäre vermessen. Ungefähr 10-15 mg (Dispersion) bzw. 1-2 mg (Rohmaterial) Probe wurden genau in die Tiegel eingewogen. Die Temperatur des Kühlblocks lag zwischen -46 und -47 °C. Soweit nicht anders angegeben, betrug die Heiz- bzw. Kühlrate 5 °C/min. Nach jedem Heiz- bzw. Kühlvorgang wurde die

erreichte Temperatur für jeweils 5 min gehalten. Die Datenauswertung erfolgte mit der Pyris Software Version 1.03. Die Kalibrierung wurde mit Indium und entmineralisiertem Wasser durchgeführt. Um die DSC-Kurven einzelner Proben besser vergleichen zu können, erfolgte eine Normierung auf die Probenmasse.

Micro-DSC III (Setaram, F-Caluire)

Ungefähr 500 mg (Dispersion) bzw. 10-20 mg (Rohmaterial) wurden genau in den Probenziegel aus Hastelloy mit einem Volumen von 850 µl eingewogen und gegen ungefähr 450 mg Undecan (Dispersionen) bzw. gegen den leeren (Rohmaterial) Referenzziegel gleichen Materials und Abmessungen unter Stickstoffatmosphäre mit Heiz- bzw. Kühlraten von 0,1 bzw. 0,5 °C/min vermessen. Nach jedem Heiz- bzw. Kühlvorgang wurde die erreichte Temperatur für jeweils 5 min gehalten. Die Datenauswertung erfolgte mit der Thermal Analysis Software Version 1.28 (Setaram). Das Gerät wurde mit β-Naphthol und entmineralisiertem Wasser hinsichtlich der Temperatur kalibriert.

Es können verschiedene Phasenübergangstemperaturen definiert werden [DIN 53 765]. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Peak- (Temperatur des Peakmaximums) als auch die extrapolierten Onset-Temperaturen (Schnittpunkt des extrapolierten linearen Anstiegs der Peak-Anstiegsflanke mit der von Temperaturen unterhalb bzw. oberhalb des Peaks extrapolierten Basislinie [DIN 53 765]) ermittelt. Die extrapolierten Onset-Temperaturen werden in der vorliegenden Arbeit vereinfacht als „Onset“ bezeichnet. Die Phasenübergangsenthalpien wurden durch Integration der Peakflächen erhalten. Vor allem die kleinen und in den Dispersionen meist auch sehr breiten flüssigkristallinen Phasenübergänge waren oft nicht voneinander getrennt, was die quantitative Bestimmung der Enthalpiewerte dieser Übergänge unsicher macht.

Es wurden prinzipiell zwei unterschiedliche Temperaturprogramme durchgeführt. Zur Untersuchung des physikochemischen Zustands der Partikel sowie zur Bestimmung des kristallinen Anteils des Matrixlipids wurden die Dispersionen von 20 bzw. 25 °C auf 90 °C aufgeheizt (1. Heizen), auf -13 bzw. -8 °C abgekühlt und anschließend noch einmal auf 90 °C aufgeheizt (2. Heizen). Für die Untersuchungen des Kristallisationsverhaltens der Nanopartikel wurden die Dispersionen zunächst von 20 °C auf -8 bzw. -13 °C abgekühlt (1. Kühlen), auf 90 °C aufgeheizt und anschließend noch einmal auf -8 bzw. -13 °C abgekühlt (2. Kühlen). Um eine bessere Basislinie zu erhalten, wurden die Proben meist vor dem ersten Kühlvorgang auf 30 °C aufgeheizt.

Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind die DSC-Kurven in den Abbildungen der vorliegenden Arbeit meist vertikal entlang der y-Achse verschoben.

3.2.7 Röntgendiffraktometrie mit Synchrotronstrahlung

Die Synchrotron-Röntgenuntersuchungen wurden an der doppelt fokussierenden Monochromator-Spiegelkamera X33 des EMBL am Speicherring DORIS des Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) durchgeführt [Koch und Bordas 1983, Rapp et al. 1995]. Die Proben wurden in einem s -Bereich von $0,1\text{--}0,6\text{ nm}^{-1}$ (Kleinwinkelbereich) und teilweise auch von $1\text{--}3,5\text{ nm}^{-1}$ (Weitwinkelbereich) untersucht. Der Streuvektor s ergibt sich aus $s = \sin \theta / \lambda$, wobei 2θ der Beugungswinkel und λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ($0,15\text{ nm}$) ist. Für die gleichzeitige Messung im Klein- und Weitwinkelbereich wurden zwei ortsempfindliche Detektoren in Serie geschaltet. Die Proben wurden in einen temperierbaren Probenträger eingefüllt und die Temperatur mittels eines Temperaturmessfühlers in einer Referenzmesszelle kontrolliert.

Wenn nicht anders angegeben, wurden fünf einminütige Einzelmessungen durchgeführt, die für die Auswertung gemittelt wurden. Datenverarbeitung und Korrekturen für die Detektorempfindlichkeit erfolgten nach dem Standardverfahren mit dem Programm SAPOKO [Konarev et al. 2003]. Die Zuordnung der Detektorkanäle zu den s -Werten erfolgte mit kristallinem Tripalmitat (Kleinwinkelreflex 1. Ordnung = $4,06\text{ nm}$ [Chapman 1962], Weitwinkelreflexe bei $0,53$, $0,46$ und $0,37\text{ nm}$ [Hoerr und Paulicka 1968]).

Zur besseren Übersicht sind die Diffraktogramme in den Abbildungen der vorliegenden Arbeit vertikal entlang der linearen Intensitäts-Achse verschoben. Wenn nicht anders angegeben, sind alle Diffraktogramme in einer Graphik auf der gleichen Intensitätsskala dargestellt.

3.2.8 Rheologische Untersuchungen

Die Messungen erfolgten mit einem Platte-Platte-Rheometer CVO 50 (Bohlin-Instruments, D-Pforzheim). Der Durchmesser der Rotorplatte betrug 40 mm und der Spalt zwischen Rotor- und Grundplatte $500\text{ }\mu\text{m}$. Die Cholesterolester wurden über die Temperaturen ihrer isotropen Schmelze aufgeheizt und die Schmelze in das temperierte Rheometer überführt. Die Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur wurde im Kühlprozess im Temperaturbereich von der isotropen Schmelze des Cholesterolesters bis $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kühlrate $0,1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) mit einer konstanten Scherrate von 20 s^{-1} gemessen. Die Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate wurde bei Temperaturen der entsprechenden flüssigkristallinen Phasen mit zunächst steigenden Scherraten von 10 s^{-1} auf 160 s^{-1} und anschließender

Verringerung der Scherrate auf den Ausgangswert gemessen. Die Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Sojaöl wurde im Kühlprozess (0,1 °C/min) in einem Temperaturbereich von 60 bis 20 °C mit einer konstanten Scherrate von 20 s⁻¹ ermittelt und die Abhängigkeit von der Scherrate bei 20 °C mit zunächst steigender Scherrate von 10 s⁻¹ auf 160 s⁻¹ und anschließender Verringerung der Scherrate auf den Ausgangswert gemessen.

3.2.9 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Leica-Mikroskop (DMRXP, Leica, D-Wetzlar) mit gekreuzten Polarisationsfiltern und Analysator verwendet. Zur Untersuchung des Phasenverhaltens wurden die Proben zwischen zwei Deckgläschen gebracht und auf einem Heiztisch mit dazugehöriger Steuereinrichtung (Heiztisch THMS 600, Temperaturkontroller TMS 92 mit Kühleinheit LNP 1, Linkam, Raczek Analysentechnik, D-Wedemark) mit Heiz- bzw. Kühlraten von 5 bzw. 10 °C kontrolliert erwärmt bzw. abgekühlt.

Ausgewählte Dispersionen wurden sowohl im Polarisationsmikroskop als auch im differentiellen Interferenzkontrast auf die Anwesenheit von größeren Partikeln bzw. von Arzneistoffpräzipitaten untersucht.

3.2.10 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden können die Form und zum Teil auch die innere Struktur kolloidaler Partikel untersucht werden. Dabei werden aus den verschiedenen Präparationsmethoden unterschiedliche Informationen erhalten. Während in der Cryo-Präparation und auch in der Negativ-Kontrastierung die Proben in Transmission betrachtet werden, sind durch die Gefrierbruchtechnik in gewissem Maße auch Einblicke in die innere Struktur der Lipidpartikel möglich.

Während sowohl die Cryo-Präparation als auch die Gefrierbruchtechnik eine sehr aufwendige Probenpräparation erfordern, ist die Negativ-Kontrastierung eine sehr schnelle und einfache Methode. Allerdings lassen sich nicht alle Dispersionen präparieren, da eine Behandlung mit Uranylacetat und eine Trocknung der Proben erforderlich sind, was zu Instabilitäten sowie Artefakten führen kann. So kam es bei den rein ladungsstabilisierten Emulsionen (Stabilisierung mit Natriumglycocholat und Natriumoleat) zu einem Zusammenfließen der Partikel. Außerdem ist eine Interpretation der Partikelgestalt vor allem bei Emulsionspartikeln mit Vorsicht vorzunehmen, da es durch den Trocknungsprozess zu einer Deformierung der Partikel kommen kann.

Gefrierbruch

Ein perforiertes Goldnetzchen (400 mesh, BAL-TEC, EM-Technologie und Applikation, D-Witten) wurde mit der Originalprobe benetzt und zwischen zwei Kupferträgerplättchen (BAL-TEC) platziert. Überschüssige Probe wurde mit Filterpapier abgesaugt und die Proben in flüssigem Propan bei -150 °C schockgefroren (JFD 030, BAL-TEC). Der Gefrierbruch erfolgte in der Gefrierbruchanlage BAF 060 (BAL-TEC) bei -150 °C und 10^{-7} bis 10^{-6} mbar. Die gefriergebrochenen Proben wurden mit einem Platin-Kohlenstoffgemisch (95:5 V/V) bis zu einer Schichtdicke von ca. 2 nm unter einem Winkel von 45 ° und anschließend mit amorphem Kohlenstoff bis zu einer Schichtdicke von ca. 20 nm zur Stabilisierung des Platinfilms bedampft. Die Replika wurden mit entmineralisiertem Wasser von dem Trägerplättchen abgeschwemmt und nach dem Trocknen mit Chloroform/Methanol (50:50 V/V) dreimal gewaschen. Die Proben wurden dann in einem Transmissionselektronenmikroskop (CEM 902A, Carl Zeiss NTS GmbH) bei einer Spannung von 80 kV betrachtet.

Negativ-Kontrastierung

5 µl verdünnte Dispersion (1:10 V/V) wurden auf ein perforiertes beglimmtes Kupfernetzchen (BAL-TEC, 200 mesh, Beschichtung mit Formvar-Kohle) mit einer Eppendorf-Pipette aufgesetzt. Nach 1 min wurde überschüssige Probe mit einem Stück Filterpapier abgesaugt und 5 µl einer gesättigten Uranylacetat-Lösung auf das Netzchen gegeben und 1 min einwirken gelassen. Anschließend wurde die Uranylacetat-Lösung mit einem Stück Filterpapier abgesaugt und die Probe nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in einem Transmissionselektronenmikroskop (CEM 902A, Carl Zeiss NTS GmbH) bei einer Spannung von 80 kV betrachtet.

Cryo-Elektronenmikroskopie

5 µl verdünnte Dispersion (1:10 V/V) wurden auf ein perforiertes Kupfernetzchen (Plano W. Plannet, D-Wetzlar, 600 mesh) bzw. ein beschichtetes Kupfernetz (Quantifoil R 1.2/1.3 (Porengröße 1,2 µm), 400 mesh) aufgegeben und der Probenüberschuss mit einem Stück Filterpapier abgesaugt. Die Probe wurde dann durch Einschießen in flüssiges Ethan bei Temperaturen von ca. -170 °C bis -180 °C in einer Cryo-Box (Carl Zeiss NTS GmbH) schockgefroren. Überschüssiges Ethan wurde mit einem Filterpapier in der Cryo-Box abgesaugt. Die Probe wurde dann mittels Cryo-Transfereinrichtungen (Carl Zeiss NTS GmbH bzw. Gatan 626 Single Tilt Cryotransfer System) in das vorgekühlte Transmissions-Cryo-

Elektronenmikroskop (CEM 902A, Carl Zeiss NTS GmbH bzw. Philipps CM 120) überführt und bei einer Spannung von 80 kV (CEM 902A) bzw. 120 kV (Philipps CM 120) betrachtet. Durch Drehen des Probenhalters von $+41^\circ$ auf -40° (Philipps CM 120) konnten die Partikel einer ausgewählten Dispersion in unterschiedlicher Ansicht dargestellt werden.

3.2.11 Chromatographische Methoden

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die qualitativen Untersuchungen der Cholesterolester sowie die Gehaltsbestimmungen erfolgten in Anlehnung an die Methode von Carroll et al. [Carroll und Rudel 1981].

Die Messungen im Rahmen der Voruntersuchungen wurden mit einer HPLC-Anlage (System Gold HPLC, 125 Pump, 7725i Sample Injection Valve mit einer 20 μ l-Schleife, 165 UV-Detector, Beckman-Coulter) mit einer Umkehrphasensäule (ODS-RP, Innendurchmesser 4,6 mm, Körnung 5 μ m, Länge 25 cm, Beckman-Coulter) und Vorsäule (ODS-RP, Innendurchmesser 4,6 mm, Körnung 5 μ m, Länge 4,5 cm, Beckman-Coulter) durchgeführt. Es wurden jeweils 50 μ l Probe in die Probenschleife injiziert. Die Bedingungen der Untersuchungen sind in Tabelle 3.2.1 aufgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 213 (Cholesterylmyristat) bzw. 254 (Arzneistoffe) nm. Die Chromatogramme wurden mit der Gold Nouveau-Software (Beckman-Coulter) ausgewertet. Die Gehaltsbestimmungen wurden dann mit einer HPLC-Anlage (System Gold HPLC, 125 Pump, 7725i Sample Injection Valve mit einer 20 μ l Schleife, 507e Autosampler, 168 Array UV-Detector, Beckman-Coulter) mit einer Umkehrphasentrennsäule (ODS-RP, Innendurchmesser 4,6 mm, Körnung 5 μ m, Länge 25 cm, Beckman-Coulter) durchgeführt. Es

Tabelle 3.2.1: Bedingungen der Gehaltsbestimmungen von Cholesterylmyristat, Ibuprofen und Etomidat im Rahmen der Voruntersuchungen.

Substanz	Lösungsmittel (V/V)	Mobile Phase (V/V)	Flussrate (ml/min)	Detektions- wellenlänge
Cholesterylmyristat	THF/ACN 80:20	THF/ACN 35:65	1,5	213 nm
Ibuprofen	THF/ACN 80:20	ACN/Wasser 75:25	1,0	254 nm
Etomidat	THF/ACN 50:50	ACN/Wasser 50:50	1,5	254 nm

Abkürzungen: THF – Tetrahydrofuran, ACT – Acetonitril.

Tabelle 3.2.2: Bedingungen der Gehaltsbestimmung von Cholesterylmyristat, Etomidat, Progesteron und Ibuprofen.

Substanz	Lösungsmittel (V/V)	Mobile Phase (V/V)	Flussrate (ml/min)	Detektions- wellenlänge ¹⁾
Cholesterylmyristat	THF/ACN 80:20	THF/ACN 50:50	1,5	213 und 254 nm
Etomidat	THF/ACN 80:20	THF/ACN/Wasser 10:40:50	1,5	213 und 254 nm
Progesteron	THF/ACN 80:20	THF/ACN/Wasser 10:40:50	1,5	213 und 254 nm
Ibuprofen	THF/ACN 80:20	THF/ACN/Wasser 10:70:20	1,5	213²⁾ und 254 nm

¹⁾ Die Wellenlängen, die für die Auswertung verwendet wurden, sind fettgedruckt.

²⁾ Für Ibuprofen wurde für die Auswertung die Wellenlänge von 213 nm wegen der besseren Auflösung des Peaks gewählt.

wurden jeweils 30 µl Probe in die Probenschleife injiziert. Die Bedingungen der Untersuchungen sind in Tabelle 3.2.2 aufgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 213 und 254 nm. Die Chromatogramme wurden mit der 32 Karat Software Version 5.0 (Beckman-Coulter) ausgewertet.

Die Ermittlung des Gehalts erfolgte rechnerisch mittels der Kalibriergeraden der entsprechenden Substanzen. Die Kalibriergeraden sowie die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen sind im Anhang A.4 aufgeführt.

Die qualitative Untersuchung der verwendeten Cholesterolester unterschiedlicher Chargen erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Lösungsmittel	THF/ACN	80:20 (V/V),
Mobile Phase	THF/ACN	20:80 und 30:70 (V/V),
Flussrate	1,0 ml/min und	
Detektion	UV-Absorption bei 213 nm.	

Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die Methode von Yao et al. [Yao und Rastetter 1985]. Es wurden 10x10 cm Hochleistungsdünnschichtplatten (nano SILGUR-20, Macherey-Nagel, D-Düren) mit einer Kombinationsschicht aus Kieselgur (Auftrags- und Vorkonzentrierungszone) und

Nanokieselgel 60 (Trennzone) verwendet. Vor der Verwendung wurden die Dünnschichtplatten durch Entwicklung mit Laufmittel A (Tab. 3.2.3) und Erhitzen auf 110 °C für 10 min aktiviert. Auf jede Platte wurden 9-11 Proben mit einer Mikroliterspritze (2 µl, Hamilton, CH-Bonaduz) punktförmig aufgetragen. Jeweils 50 µl Dispersion bzw. 10 mg Lipid wurden in jeweils 450 bzw. 1000 µl Chloroform/Methanol (50:50 V/V) gelöst. Um Lipide mit unterschiedlichen Polaritäten aufzutrennen, wurden die Platten mehrfach entwickelt. Die Zusammensetzung und Funktion der Laufmittel sind in Tabelle 3.2.3 angegeben.

Die Platten wurden mit Laufmittel A bis zu einer Höhe von 4,6 cm (über der Vorkonzentrationszone) und anschließend jeweils mit Laufmittel B und C vollständig entwickelt. Die Platten wurden vor dem Einstellen in eine neue Kammer jeweils sorgfältig getrocknet.

Die Detektion der Lipidflecke erfolgte durch Eintauchen der entwickelten und getrockneten Platten in eine Färbelösung (75 g Kupfersulfat*5 H₂O, 100 ml Phosphorsäure 85%, 900 ml gereinigtes Wasser) für ca. 3 Sekunden und nachfolgendes Erhitzen auf 170 °C im Heißluftschrank für 5-8 Minuten.

Die Identifizierung der Lipidflecke erfolgte mit einem Standard-Lipid-Gemisch mit Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol, Sulfolgalactosylceramid, Galactosylceramid, Monoglycerid, Cholesterol, Fettsäure, Triglycerid, Cholesterolester und Squalen (in Reihenfolge steigender Laufhöhe auf der TLC-Platte).

Für die halbquantitative Auswertung wurden die entwickelten TLC-Platten gescannt und mit dem Programm Scion-Image (Scion-Corp. 2000) densitometrisch ausgewertet.

Tabelle 3.2.3: Zusammensetzung und Funktion der Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie.

Laufmittel	Funktion	Zusammensetzung (V/V)
A	Auftrennung polarer Lipide (z.B. Phospholipide, Mono- und Diglyceride)	26,6 Teile Methylacetat
		26,6 Teile 1-Propanol
		26,6 Teile Chloroform
		10,6 Teile Methanol
		9,6 Teile Kaliumchlorid-Lösung 0,25% (m/V)
B	Auftrennung apolarer Lipide (z.B. Triglyceride und Cholesterolester)	75,0 Teile n-Hexan
		23,0 Teile Diethylether
		2,0 Teile wasserfreie Essigsäure
C	Verbesserung der Trennergebnisse	100 Teile n-Hexan

3.2.12 Messung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Ansätze der wässrigen Phasen (2,25% Glycerol und 0,01% Thiomersal) sowie der Dispersionen, die für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendet wurden, wurde mit dem pH-Meter MP 225 (Mettler-Toledo, D-Giessen) mit einer Polymerelektrode (InLab 415) mit integriertem Pt-100-Messfühler gemessen. Aufgrund der relativ hohen benötigten Probenmengen wurde der pH-Wert der Dispersionen nicht routinemäßig gemessen. Nach der Messung wurden die Proben wegen möglicher Kontamination verworfen.

3.2.13 Messung der Osmolalität

Die Osmolalität der Ansätze der wässrigen Phase (2,25% Glycerol und 0,01% Thiomersal) sowie der Dispersionen, die für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendet wurden, wurde mit einem KNAUER Semi-Micro Osmometer (Knauer, D-Berlin) gemessen. Das Gerät wurde vor den Messungen mit entmineralisiertem Wasser (0 mOsmol/kg) und einer 1,2687%igen Lösung (m/m) von reinstem getrockneten Natriumchlorid (400 mOsmol/kg, Knauer) kalibriert.

3.2.14 Zellkultur und Untersuchungen zur in vitro-Toxizität

Die Kultur tiefgefrorener Maus-Fibroblasten der Zell-Linie L929 wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-Braunschweig, DSMZ-Nummer der Zelllinie ACC 2) bezogen. Als Wachstumsmedium wurde RPMI 1640-Medium (mit HEPES, L-Glutamin und Phenolrot, PAA Laboratories, A-Pasching) verwendet, dem 10% fötales Kälberserum (FCS, Sigma) sowie 2% einer Penicillin G/Streptomycin-Lösung (10 000 Einheiten/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin, Sigma) zugesetzt wurden (V/V). Das fertige Wachstumsmedium wurde in Ansätzen von max. 500 ml bei 4 °C gelagert. Die Kultivierung und Vermehrung der Zellen erfolgte in T75-Kulturflaschen aus Kunststoff mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Nunc A/S, DK-Roskilde bzw. greiner-bio-one, D-Frickhausen). Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden die Zellen in Zellkultur-Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen (96-well-plates) sowie durchsichtigem Boden und Deckel (Nunc A/S, DK-Roskilde bzw. greiner-bio-one) ausgesät. Die Kulturflaschen und -platten wurden in einem Brutschrank (Binder, D-Tuttlingen) bei 37 °C und einer Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid gelagert.

Die Arbeiten mit den Zellen erfolgten unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank (HERA-Safe, Klasse II, Kendro, D-Hanau). Vor Beginn der Arbeiten wurden die Arbeitsflächen der Werkbank mit 2%iger Wofasept FL-Lösung (Kesla Chemie, D-Wolfen) und die in die Werkbank eingebrachten nichtsterilen Materialien mit 70%igen Ethanol desinfiziert. Die

Herstellung von Lösungen sowie Verdünnungen erfolgte in Falcon-Röhrchen mit Schraubverschluss (PP-Test tubes, Cellstar, greiner-bio-one) bzw. in Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen (Cellstar, greiner-bio-one). Die Medien, Zellsuspensionen usw. wurden mit Hilfe steriler Einmalmesspipetten aus Kunststoff (Serological Pipettes 1, 2, 5, 10 und 25 ml, Cellstar, greiner-bio-one) überführt. Zu verwerfende Lösungen, Zellsuspensionen usw. wurden mit sterilisierten Pasteurpipetten mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Vacusafe, Integra Bioscience, D-Fernwald) abgesaugt.

Zur Beurteilung des Aussehens der Zellkulturen wurde ein Leica-Auflichtmikroskop (Leica-DMIL, Leitz, D-Wetzlar) verwendet.

Auftauen tiefgefrorener Zellen

10 ml Wachstumsmedium wurden auf Raumtemperatur aufgewärmt und in ein Falcon-Röhrchen vorgelegt. Nach Entnahme aus dem flüssigem Stickstoff wurde die eingefrorene Zelldispersion in einem Wasserbad (37 °C) unter Schwenken des Cryo-Röhrchens aufgetaut, in das Falcon-Röhrchen mit dem Wachstumsmedium überführt und mit 300 rpm für 6 Minuten bei 23 °C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge, Eppendorf, D-Hamburg). Der klare Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 2 ml Wachstumsmedium redispergiert und in eine T75-Kulturflasche (15 ml Medium) ausgesät.

Einfrieren der Zellen

Das Medium über dem Zellrasen wurde abgesaugt und nach zweimaligem Spülen des Zellrasens mit je 5 ml auf 37 °C erwärmten PBS-Puffer (0,146 % Dinatriumhydrogenphosphat*2 H₂O, 0,02% Kaliumdihydrogenphosphat, 0,8% Natriumchlorid und 0,02% Kaliumchlorid in Gereinigtem Wasser, m/V) wurden 2,5 ml auf 37 °C erwärmte 0,25%ige Trypsin-Lösung (Sigma) einpipettiert. Nach Inkubation für 3 min im Brutschrank wurde das vollständige Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Durch horizontales Abklopfen der Kulturflasche wurden eventuell noch anhaftende Zellen abgelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden 5 ml auf 37 °C erwärmtes Wachstumsmedium in die Kulturflasche einpipettiert und die Zellsuspension nach Überführen in ein Falcon-Röhrchen mit 300 rpm für 6 min bei 23 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in einer entsprechenden Menge Wachstumsmedium durch Auf- und Abpipettieren redispergiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (s.u.) bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann mit Wachstumsmedium auf die erforderliche Zellzahl verdünnt. Anschließend wurde ein dem Wachstumsmedium entsprechendes Volumen gekühltes konzentriertes Einfriermedium (20% DMSO, 20% FCS, 60% Wachstumsmedium)

tropfenweise unter Schwenken des Falcon-Röhrchens zugegeben. In jedes Cryo-Röhrchen (Cryo.S Cellstar, greiner-bio-one) wurde 1 ml Zelldispersion einpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen in das Lagergefäß mit flüssigem Stickstoff (Chronos Biosafe, Messer-Greisheim, D-Krefeld) überführt.

Subkultivierung

Das Ablösen der Zellen von dem Boden der Kulturflasche erfolgte wie im Abschnitt „Einfrieren der Zellen“ beschrieben. Nach der Zellzählung wurden jeweils $1-2 \cdot 10^6$ Zellen in T75-Kulturflaschen ausgesät und die Kulturflaschen mit Wachstumsmedium auf 15 ml aufgefüllt. Die Kulturflaschen wurden im Brutschrank gelagert und täglich unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Bei gelblicher Färbung des Mediums wurde das Wachstumsmedium gewechselt.

Zellzahlbestimmung (Neubauer-Zählkammer)

20 µl Zellsuspension wurden zu 180 µl Trypan-Blau-Lösung (0,4%, Sigma) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren dispergiert. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Supe Rior, D-Marienfeld) mit Vertiefungen für ein definiertes Volumen (Tiefe 0,100 mm, Fläche je Quadrat 0,0025 mm²). Es wurden die Zellen in mindestens 4 großen Quadranten gezählt und der Mittelwert errechnet. Eine Multiplikation dieses Wertes mit 10^5 ergibt bei einer 1:10-Verdünnung die Zellzahl je ml.

Beschicken von 96-Mikrotiter-Platten

Die 96-Mikrotiter-Platten weisen jeweils 12 nebeneinander (1-12) und 8 untereinander liegende (A-H) Vertiefungen auf (Abb. 3.2.3). Die Beschickung der Platten erfolgte mit einer Mehrkanal-Eppendorf-Pipette (Research Pro 300 mit 8 Kanälen und den dazugehörigen Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Standard 20-300 µl, Eppendorf, D-Hamburg), d.h., es wurden jeweils die 8 untereinander liegenden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (A-H) gleich behandelt. Konnte aufgrund der geringen Flüssigkeitsmenge (z.B. Dispersionen, MTT-Lösung) nicht mit der 8-Kanal Pipette gearbeitet werden, wurden die Substanzen

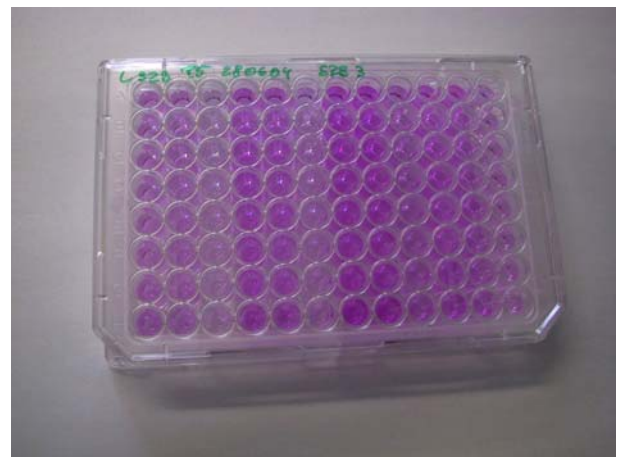


Abbildung 3.2.3: Mikrotiterplatte eines Ansatzes für den SRB-Test.

mit einer einfachen Eppendorf-Pipette in die Vertiefungen der Kulturplatten überführt.

Die konzentrierte Zellsuspension wurde auf die gewünschte Zellzahl/ml mit auf 37 °C erwärmtem Wachstumsmedium verdünnt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren dispergiert. Die verdünnte Zellsuspension wurde dann in längliche Probenschalen (Reagent Basin 60 ml, Thermo Labsystems Oy, Fi-Vantaa), die eine Entnahme mit der Mehrkanalpipette erlauben, überführt. Die Probenschalen wurden zur Vermeidung des Absetzens der Zellen während des gesamten Pipettiervorgangs bewegt (Variomag Teleshake mit Shakemodul, H + P Labortechnik, D-Oberschleißheim). Wenn nicht anders angegeben, wurden bei den in vitro-Toxizitätsuntersuchungen jeweils 100 µl Zelldispersion ($5 \cdot 10^4$ Zellen/ml), also 5000 Zellen je Vertiefung, ausgesät. Die Vertiefungen wurden anschließend jeweils mit 100 µl auf 37 °C erwärmten Wachstumsmedium aufgefüllt und die Platten im Brutschrank gelagert. Nach 12 Stunden wurden, wenn nicht anders angegeben, jeweils 20 µl Wachstumsmedium abgenommen und durch 20 µl auf 37 °C erwärmte und eventuell verdünnte Dispersion ersetzt. Die Mikrotiterplatten wurden für 6 (MTT-Test) bzw. 9 und 12 Stunden (SRB-Test) im Brutschrank inkubiert. Beim MTT-Test wurden die Platten nach Zugabe der MTT-Lösung noch weitere 3 Stunden im Brutschrank gelagert, so dass sich für den MTT-Test eine Gesamtinkubationszeit von 9 Stunden ergibt. Die in vitro-Toxizität wurde dann wie unten beschrieben bestimmt.

Zur Kontrolle wurden in je 8 Vertiefungen der Mikrotiterplatten keine Zellen ausgesät (reines Wachstumsmedium), in je 2x8 Vertiefungen die Zellen nicht mit den zu prüfenden Dispersionen versetzt (Kontrolle) und in weitere 8 Vertiefungen eine der Probenmenge entsprechendes Volumen einer Glycerol-Wasser-Mischung (2,25% Glycerol m/m) einpipettiert. Die relative Überlebensrate der Zellen wurde dann wie folgt bestimmt:

$$\text{Überlebensrate} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Test}}}{\text{Absorption}_{\text{Kontrolle}}} * 100$$

SRB-Test

Das Testmedium über dem Zellrasen wurde vorsichtig abgenommen und in jede Vertiefung 100 µl einer 10%igen Trichloressigsäurelösung (m/m) zugegeben. Die Platten wurden dann für 1 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Platten fünfmal mit gereinigtem Wasser gespült und über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. In die getrockneten Vertiefungen wurden jeweils 50 µl Sulforhodamin-B-Lösung (0,4% Sulforhodamin B in 0,1%iger Essigsäure, m/V) einpipettiert und die Platten ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann 3-5mal mit 0,1%iger Essigsäure (V/V)

zünftig gespült. Nach dem Trocknen der Platten wurde der auf dem Boden der Vertiefungen gebundene Farbstoff mit 200 µl einer Lösung von Tris-Base (10 mM) gelöst. Hierzu wurden die Platten ca. 10-20 min auf einem Schüttler (Variomag Teleshake) gelagert. Die Lösungen von jeweils zwei untereinander liegenden Vertiefungen (gleiche Behandlung der Zellen bzw. Blindwert) wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 565 nm gegen Tris-Base (10 mM) gemessen (DU 640 Spectrophotometer, Beckman-Coulter).

MTT-Test

Der MTT-Test wurde mit einem in vitro-Toxizitäts-Assay Kit (Sigma) in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach Inkubation mit den zu untersuchenden Proben wurden in jede Vertiefung 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) hinzupipettiert. Die Platten wurden dann für einige Minuten vorsichtig geschüttelt (Variomag Teleshake) und anschließend für 3 Stunden im Brutschrank gelagert. Die Platten wurden zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge, Eppendorf, D-Hamburg, 300 rpm, 6 min) und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Es wurde dann in jede Vertiefung 200 µl der Solubilisierungs-Lösung (10% Triton X-100, 0,1 N HCl in wasserfreiem Isopropanol) einpipettiert und der gebildete blaue Farbstoff gelöst. Die Lösungen von jeweils zwei untereinander liegenden Vertiefungen (gleiche Behandlung der Zellen bzw. Blindwert) wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen die Solubilisierungs-Lösung gemessen (DU 640 Spectrophotometer, Beckman-Coulter).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Untersuchung der Rohmaterialien

Viele Cholesterolester sind physiologische Lipide, die aufgrund ihrer Molekülstruktur (stark anisometrische und langgestreckte Molekülgestalt) thermotrop flüssigkristalline Phasen (Kapitel 2.3) ausbilden können [Ginsburg 1984]. In der vorliegenden Arbeit wurden als Matrixlipide für die Herstellung smektischer Nanopartikel gesättigte Cholesterolester mit unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen (Cholesterylmyristat sowie Cholesterylpalmitat und -nonanoat) und das ungesättigte Cholesteryloleat verwendet. Während Cholesterylmyristat, -palmitat und -oleat physiologische Lipide darstellen [Deckelbaum et al. 1977, McKeene et al. 1993], enthält Cholesterylnonanoat eine nicht-physiologische Fettsäurekette mit neun C-Atomen. Dieser Ester wurde aufgrund seiner sehr starken Unterkühlungstendenz der smektischen Phase verwendet.

Im Folgenden sind die Untersuchungen der Bulk-Lipide dargestellt. Die Kenntnis der Eigenschaften sowie des Phasenverhaltens der Rohmaterialien ist Voraussetzung für die Entwicklung der entsprechenden kolloidalen Systeme wie auch für die Beurteilung ihrer Eigenschaften. Da für die vorliegende Arbeit die flüssigkristallinen Phasen – insbesondere die smektische Phase – von Bedeutung sind, war der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die flüssigkristallinen Phasen gerichtet.

Mit Hilfe von polarisationsmikroskopischen, DSC- und Röntgenuntersuchungen können die thermotropen Mesophasen eindeutig charakterisiert werden [Kumar 2001, Kelker und Hatz 1980]. Sowohl smektische als auch cholesterische Mesophasen zeigen im Polarisationsmikroskop charakteristische Texturen. In der DSC sind die flüssigkristallinen Phasenumwandlungen mit kleinen, aber scharfen Übergängen verbunden. Aufgrund ihrer Schichtstruktur gibt die smektische Phase einen sehr scharfen Röntgenkleinwinkelreflex, während die cholesterische Phase nur einen uncharakteristischen sehr kleinen und breiten Reflex zeigt. Im Weitwinkelbereich wird für beide Mesophasen aufgrund der fehlenden Nahordnung der Moleküle nur ein breiter, diffuser Reflex ähnlich dem der isotrop flüssigen Phase beobachtet.

4.1.1 Phasenverhalten der verwendeten Cholesterolester

Cholesterylmyristat

Cholesterylmyristat wurde aufgrund seines vollständig reversiblen Phasenverhaltens als Modellmatrixlipid für die Herstellung smektischer Nanopartikel eingesetzt. Das Phasenverhalten dieses Esters wurde bereits in den 60er und 70er Jahren intensiv untersucht [Ginsburg et al. 1984, Barrall et al. 1967a und b, Davis et al. 1970, Wendorff und Price 1973, McMillan 1972, Craven und deTitta 1976, Sakamoto et al. 1969].

Beim Aufheizen im Polarisationsmikroskop ($5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) schmolz die kristalline Substanz bei ca. $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Bildung der für die smektische Phase charakteristischen fokal-konischen Flächentextur, die sich bei ca. $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in die cholesterische Textur umlagerte. Beim Übergang der smektischen in die cholesterische Phase wurde häufig ein starkes Fließen der Struktur unter Ausbildung einer Schlierentextur beobachtet. Bei ca. $85,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ verschwand die optische Aktivität unter Bildung der isotropen Schmelze. Beim Abkühlen wurden die gleichen Phasenübergänge mit einer geringen Unterkühlungstendenz der flüssigkristallinen Phasenübergänge beobachtet. Da die cholesterische Phase nur über einen sehr geringen Temperaturbereich existent ist, kam es insbesondere beim schnellen Abkühlen (Kühlrate $> 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) oft nicht zu einer vollständigen Ausbildung der charakteristischen Textur. Die Kristallisation trat zwischen 50 und $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein. Die charakteristischen Texturen der Phasen sind in Abbildung 4.1.1 gezeigt.

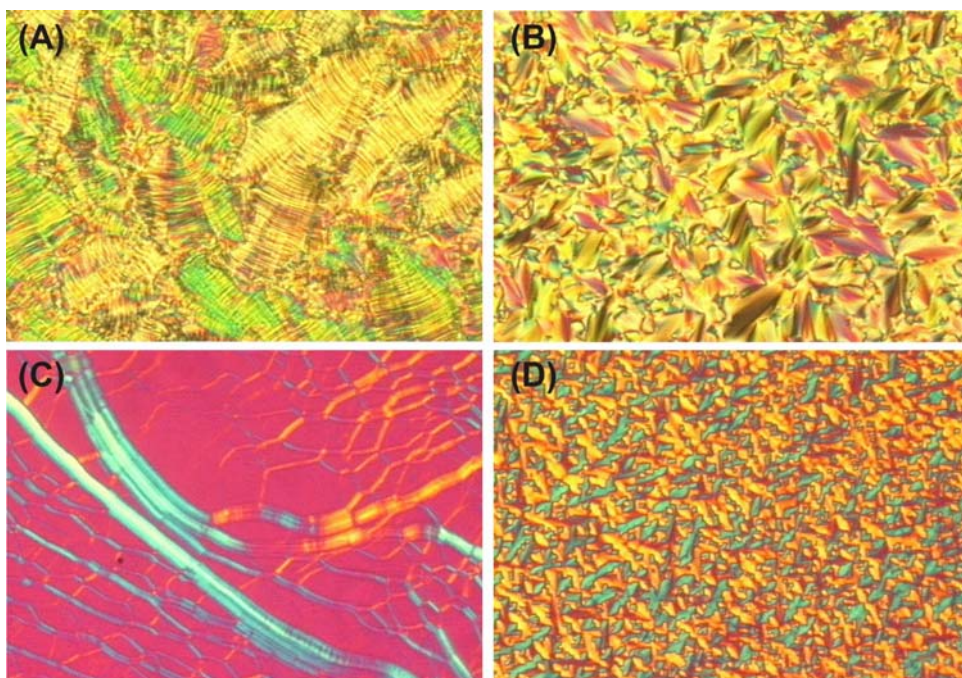


Abbildung 4.1.1: Polarisationsmikroskopische Texturen von Cholesterylmyristat: frisch kristallisierte Probe (A), smektische Phase im Kühlprozess bei $77,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B), Schlierentextur im Heizprozess bei $80,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C) und cholesterische Phase im Kühlprozess bei $78,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D). Aufnahmen mit 200facher Vergrößerung.

Die Ergebnisse der DSC-Messungen sind in guter Übereinstimmung mit den polarisationsmikroskopischen Beobachtungen. Die mittleren Übergangstemperaturen der DSC-Untersuchungen (5 °C/min) sowie die mittleren Enthalpien sind in Tabelle 4.1.1 aufgeführt. Die Messwerte der Einzelmessungen sind im Anhang (A.2.1) aufgelistet.

Abbildung 4.1.2 zeigt die typischen DSC-Heiz- und Kühlkurven von Cholesterylmyristat. Im Vergleich zum Schmelzen der kristallinen Substanz (Kettenschmelzen) waren die flüssig-kristallinen Übergänge (smektisch-cholesterisch und cholesterisch-isotrop) mit einer deutlich geringeren Enthalpieänderung verbunden und zeigten nur eine leichte Unterkühlungstendenz von ungefähr 0,5-1 °C beim anschließenden Kühlvorgang (Tab. 4.1.1). Die Kristallisation, welche die Anordnung der einzelnen Fettsäureketten in einem hoch geordneten Kristallgitter erfordert und aus diesem Grund mit einer hohen Enthalpieänderung verbunden ist, setzte erst unterhalb von 50 °C ein. Das Kristallisationsereignis war meist sehr breit und von Messung zu Messung sowie von Charge zu Charge nicht so gut reproduzierbar wie die anderen Phasenübergänge. Manchmal wurde auch ein zweigipfliges Kristallisationsgeschehen beobachtet.

Tabelle 4.1.1: DSC-Untersuchungen verschiedener Cholesterylmyristat-Chargen: Phasenübergangstemperaturen und -enthalpien der Heiz- und Kühlvorgänge.

1. Heizen			Kühlen		2. Heizen	
<i>Kristallin-smektischer (Schmelzen) bzw. smektisch-kristalliner Phasenübergang (Kristallisation)</i>						
Temperatur (°C)	P	71,6 ± 0,3	P	35,8 ± 6,5	P	71,2 ± 0,2
	O	70,5 ± 0,2	O	38,3 ± 6,2	O	70,1 ± 0,2
Enthalpie (J/g)		76,82 ± 0,30		-59,04 ± 2,90		76,03 ± 0,25
<i>Smektisch-cholesterischer bzw. cholesterisch-smektischer Übergang</i>						
Temperatur (°C)	P	78,9 ± 0,8	P	78,1 ± 1,0	P	78,8 ± 0,9
	O	78,6 ± 0,9	O	78,3 ± 1,0	O	78,6 ± 0,9
Enthalpie (J/g)		2,41 ± 0,09		-2,52 ± 0,11		2,40 ± 0,08
<i>Cholesterisch-isotroper bzw. isotrop-cholesterischer Übergang</i>						
Temperatur (°C)	P	84,3 ± 0,9	P	83,6 ± 1,2	P	84,2 ± 1,1
	O	83,84 ± 1,15	O	83,8 ± 1,1	O	83,9 ± 1,2
Enthalpie (J/g)		1,77 ± 0,17		-2,03 ± 0,07		1,95 ± 0,27

Es sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung von 4 unterschiedlichen Cholesterylmyristat-Chargen angegeben.

Die Proben wurden mit 5 °C/min von 20 auf 95 °C aufgeheizt (1. Heizen), auf 0 °C abgekühlt (Kühlen) und anschließend noch einmal auf 95 °C aufgeheizt (2. Heizen). Phasenübergangstemperaturen: O – Onset-, P – Peak-Temperatur.

Tabelle 4.1.2 zeigt die Onset- und Peak-Temperaturen von DSC-Messungen mit unterschiedlichen Scanraten. Erwartungsgemäß wurden die Onset-Werte mit Ausnahme des Kristallisationsprozesses kaum von der Heiz- bzw. Kühlrate beeinflusst [Höhne et al. 2003]. Für den Kristallisationsprozess wurde neben der Abnahme der Peak- und Onset-Temperaturen (Tab. 4.1.2) auch eine deutliche Abnahme der Kristallisationsenthalpie mit steigender Kühlrate beobachtet (Abb. 4.1.3). Bei allen Kühlraten war die Kristallisationsenthalpie deutlich niedriger als die Schmelzenthalpie (ca. 78% der Enthalpie des nachfolgenden Schmelzvorgangs bei einer Heiz- und Kühlrate von 5 °C/min, Abb. 4.1.3), was wahrscheinlich auf eine zunehmend unvollständige Kristallisation bzw. vermehrte Bildung von Fehlstellen mit steigender Kühlrate zurückgeführt werden kann.

Die frisch kristallisierte Probe (2. Heizen) schmolz in Abhängigkeit von der Heiz- und Kühlrate mit einer geringeren Enthalpie und bei tieferen Temperaturen im Vergleich zur thermisch unbehandelten Substanz (1. Heizen, Abb. 4.1.3), was wahrscheinlich auch auf eine mehr oder weniger starke Unvollständigkeit der Kristallisation bei höheren Scanraten zurückzuführen ist. Nur bei sehr geringen Heiz- und Kühlraten (0,1 °C/min) wurden meist keine Unterschiede der Schmelzvorgänge des 1. und 2. Heizens gefunden.

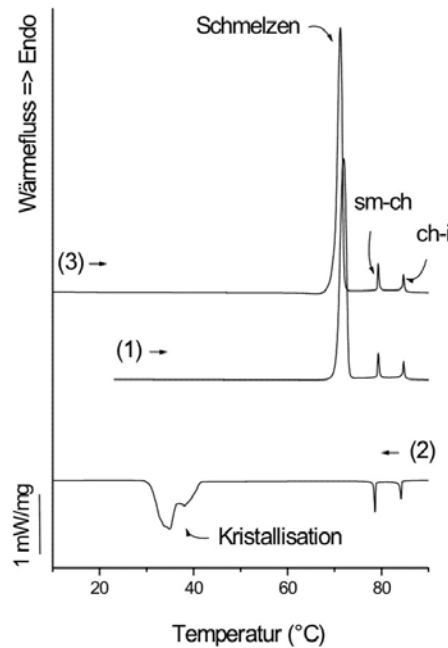


Abbildung 4.1.2: DSC-Heiz- und Kühlkurven von Cholesterylmyristat. Die Substanz wurde mit einer Heiz- bzw. Kühlrate von 5 °C/min von 20 auf 95 °C aufgeheizt (1), auf 0 °C abgekühlt (2) und anschließend noch einmal auf 95 °C aufgeheizt (3).

Tabelle 4.1.2: Abhängigkeit der DSC-Peak- und Onset-Temperaturen von der Heiz- bzw. Kühlrate.

Heizrate (°C/min)	Schmelzen (2. Heizen)		smektisch-cholesterischer Übergang (2. Heizen)		cholesterisch-isotroper Übergang (2. Heizen)		Kristallisation (Kühlen)	
	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)
10	71,3	69,6	78,8	78,4	84,3	83,9	29,3	33,9
5	70,9	69,8	78,8	78,6	84,3	84,0	32,2	35,0
1	70,5	69,6	78,5	78,4	84,0	83,9	42,3	43,1

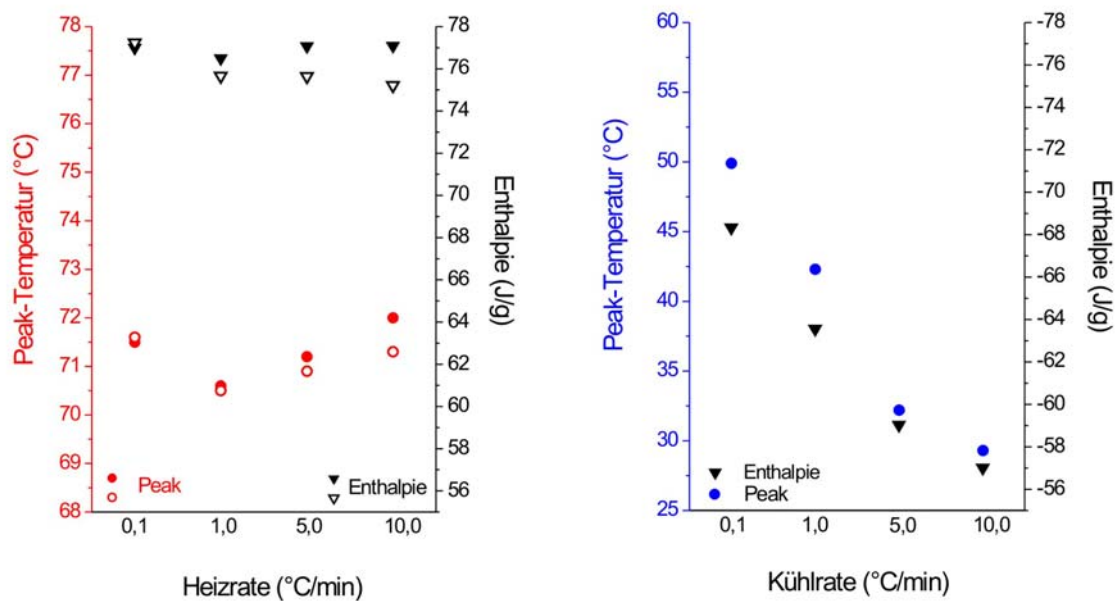


Abbildung 4.1.3: Abhängigkeit der Peak-Temperaturen und Enthalpien des Schmelz- (links, geschlossene Symbole = 1. Heizen, offene Symbole = 2. Heizen) und Kristallisationsvorgangs (rechts) in Abhängigkeit von der Heiz- und Kühlrate. Die Messungen erfolgten in einer Micro-DSC III (0,1 °C/min) und in einem Pyris-1 Gerät (1, 5 und 10 °C/min).

Das Phasenverhalten von Cholesterylmyristat blieb auch bei mehrmaligem Aufheizen und Abkühlen (10 °C/min) vollständig reversibel ohne deutliche Änderung der Phasenübergangstemperaturen und -enthalpien, ausgenommen des Schmelzvorganges der thermisch unbehandelten Substanz.

Kristallines Cholesterylmyristat (Messung bei 20 °C) zeigt charakteristische Röntgenklein- und -weitwinkelreflexe (Abb. 4.1.4) mit einem Schichtabstand von 50,7 Å (d-spacing, Reflex 1. Ordnung im Kleinwinkelbereich). Beim Abkühlen der isotropen Schmelze wurde im Temperaturbereich der cholesterischen Phase nur ein sehr breiter Reflex bei ca. 32,6 Å mit geringer Intensität im Kleinwinkelbereich beobachtet (Abb. 4.1.5). Nach weiterem Abkühlen wurde der für die smektische Phase charakteristische scharfe Reflex sichtbar, der sich mit abnehmender Temperatur zu kleineren Winkeln (Zunahme des Schichtabstandes) verschob (Abb. 4.1.5). Bei 60 °C wurde ein

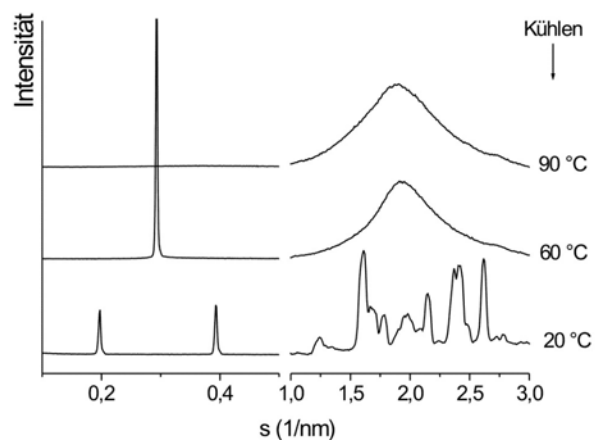


Abbildung 4.1.4: Röntgenklein- und -weitwinkelreflexe der isotropen (90 °C), smektischen (60 °C) und kristallinen Phase (20 °C) von Cholesterylmyristat im Kühlprozess.

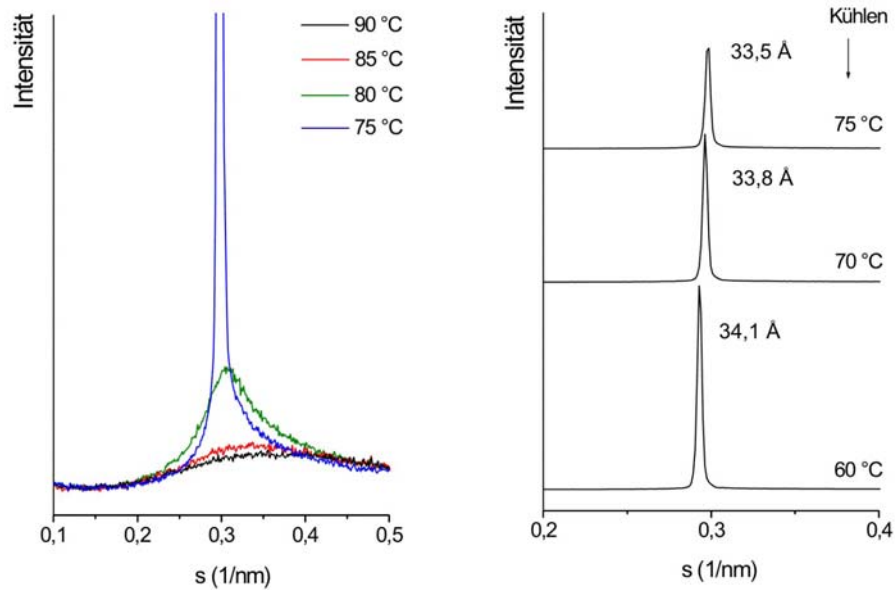


Abbildung 4.1.5: Röntgenkleinwinkelreflexe der flüssigkristallinen Phasen von Cholesterylmyristat im Kühlprozess. Links: Reflex der cholesterischen Phase bei 80 °C (grün) im Vergleich zum smektischen Reflex (blau) bei 75 °C. Rechts: Verschiebung der Lage des smektischen Reflexes mit abnehmender Temperatur.

Schichtabstand von 34,1 Å gemessen. Beide flüssigkristallinen Phasen zeigen im Weitwinkelbereich aufgrund der Mobilität der einzelnen Moleküle nur eine diffuse Streuung vergleichbar der der isotropen flüssigen Phase (Abb. 4.1.4).

Cholesterylpalmitat

Im Gegensatz zu Cholesterylmyristat zeigt das Palmitat monotropes Phasenverhalten (Abb. 4.1.6). Die smektische und – bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanz – auch cholesterische Phase sind bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunkts der kristallinen Substanz existent, so dass sie nur beim Abkühlen aus der isotropen Schmelze gebildet wurden. Beim Aufheizen der kristallinen Substanz in der DSC (10 °C/min, Abb. 4.1.6) wurden zwei endotherme Ereignisse beobachtet: ein kleines Ereignis bei 56,7 °C (Onset) mit einer Enthalpie von 4,55 J/g und der Hauptschmelzpeak bei 75,0 °C (Onset) mit einer Schmelzenthalpie von 88,67 J/g. Ein flüssigkristalliner Übergang (cholesterisch-isotroper Übergang), wie er in der Literatur beschrieben ist [Ginsburg et al. 1984, Davis et al. 1970, Vogel et al. 1971], wurde nicht beobachtet. Beim Abkühlen der isotropen Schmelze waren die beiden flüssigkristallinen Übergänge deutlich zu erkennen: der isotrop-cholesterische Übergang bei 75,1 °C (Onset) mit einer Enthalpie von -3,02 J/g und der cholesterisch-smektische Übergang bei 70,8 °C (Onset) mit einer Enthalpie von -4,69 J/g. Die Kristallisation setzte im Vergleich zu Cholesterylmyristat bei höheren Temperaturen ein, wobei auch hier die Kristallisationstemperatur stark von der Kühlrate abhängig war. Beim

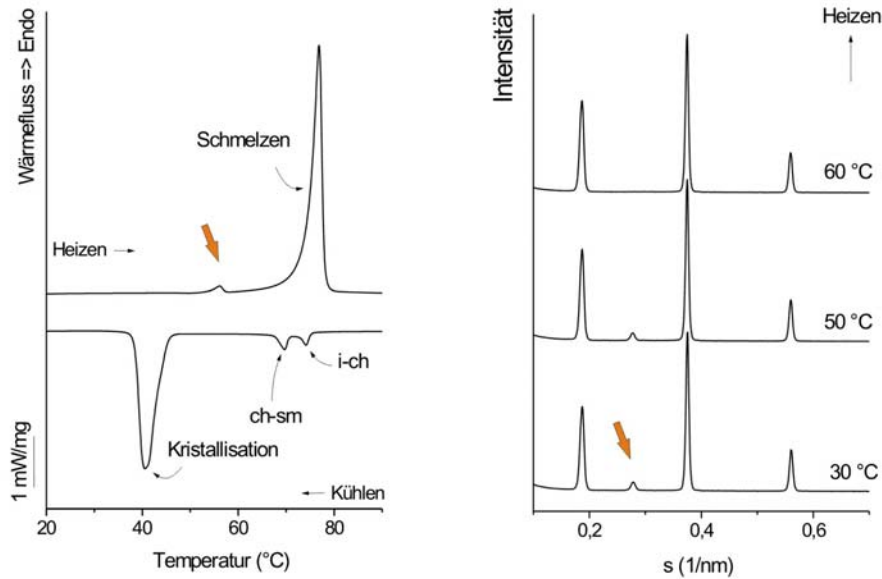


Abbildung 4.1.6: DSC- und Röntgenuntersuchungen von Cholesterylpalmitat. Links: DSC-Heizkurve einer frisch kristallisierten Probe und anschließende Kühlkurve (10 °C/min). Rechts: Röntgenkleinwinkelreflexe der kristallinen Substanz im Heizprozess. Die Pfeile in den Graphiken markieren das DSC-Ereignis und den Röntgenreflex, die nicht auf Cholesterylpalmitat zurückgeführt werden können.

Kühlen mit 10 °C/min lag die Onset-Temperatur der Kristallisation bei 44,1 °C, beim Kühlen mit 5 °C/min bei 44,8 °C und beim Kühlen mit 1 °C/min bei 68,6 °C. Bei dieser Kühlrate war der cholesterisch-smektische Phasenübergang von der Kristallisation überlagert.

Für die kristalline Substanz wurde die charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflexe beobachtet mit einem Schichtabstand von 53,4 Å (Reflex 1. Ordnung) bei 20 °C. Neben diesen Reflexen wurde ein weiterer Reflex geringer Intensität bei 0,2789 nm⁻¹ (Schichtabstand 35,9 Å) beobachtet, der nicht auf das kristalline Cholesterylpalmitat zurückgeführt werden kann (Abb. 4.1.6). Dieser Reflex verschwand bei etwa 60 °C und erschien beim anschließenden Abkühlen wieder. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den in der DSC beobachteten endothermen Ereignissen in den Heizvorgängen und wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der Substanz zurückzuführen. Der Schichtabstand der smektischen Phase wurde im Kühlprozess bestimmt und betrug 36,1 Å bei 70 °C.

Cholesterylnonanoat

Cholesterylnonanoat ist der erste Cholesteroester der homologen Reihe, der eine smektische Phase bildet. Die smektische Phase ist nur bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes der kristallinen Substanz existent. Beim Aufheizen in der DSC (10 °C/min, Abb. 4.1.7) schmolz der Ester bei 75,9 °C (Onset) mit einer Enthalpie von 46,19 J/g unter Ausbildung einer cholesterischen Phase, die sich bei 91,5 °C (Onset) in die isotrope Phase umlagerte

(Enthalpie 1,33 J/g). Beim Abkühlen wurde sowohl die cholesterische (Onset 91,5 °C, Enthalpie -1,51 J/g) als auch die smektische Phase (Onset 74,1 °C, Enthalpie -0,82 J/g) gebildet (Abb. 4.1.7). Cholesterylnonanoat zeigte eine sehr starke Unterkühlungstendenz der smektischen Phase auch im nicht dispergierten Zustand. Beim Kühlen auf 0 °C trat die Kristallisation nur bei geringer Kühlrate (1 °C/min) bei ca. 26 °C ein. Bei Kühlraten von 5 bzw. 10 °C/min kristallisierte der Ester erst beim nachfolgenden Aufheizen zwischen 10 und 30 °C mit einem Onset von 21,9 °C und einer Enthalpie von -22,52 J/g bei einer Heizrate von 5 °C/min.

Die kristalline, thermisch nicht vorbehandelte Substanz gibt zwei Röntgenkleinwinkelreflexe mit einem Schichtabstand von 14,5 Å (Reflex 1. Ordnung, Abb. 4.1.7). Das Röntgenkleinwinkel-Diffraktogramm der frisch kristallisierten Probe unterschied sich deutlich von dem der thermisch nicht vorbehandelten und zeigte zusätzliche Reflexe: einen sehr scharfen Reflex relativ hoher Intensität bei $0,6498 \text{ nm}^{-1}$ (Schichtabstand 15,4 Å) sowie weitere intensitätsarme Reflexe unter anderem bei $0,3202 \text{ nm}^{-1}$ (Schichtabstand 31,1 Å), was auf eine veränderte Anordnung der Moleküle im Kristallgitter der frisch kristallisierten Substanz hinweist (Abb. 4.1.7). Für die smektische Phase wurde ein Schichtabstand (Röntgenkleinwinkelreflex) von 27,5 Å bei 60 °C und von 27,8 Å bei 40 °C gemessen.

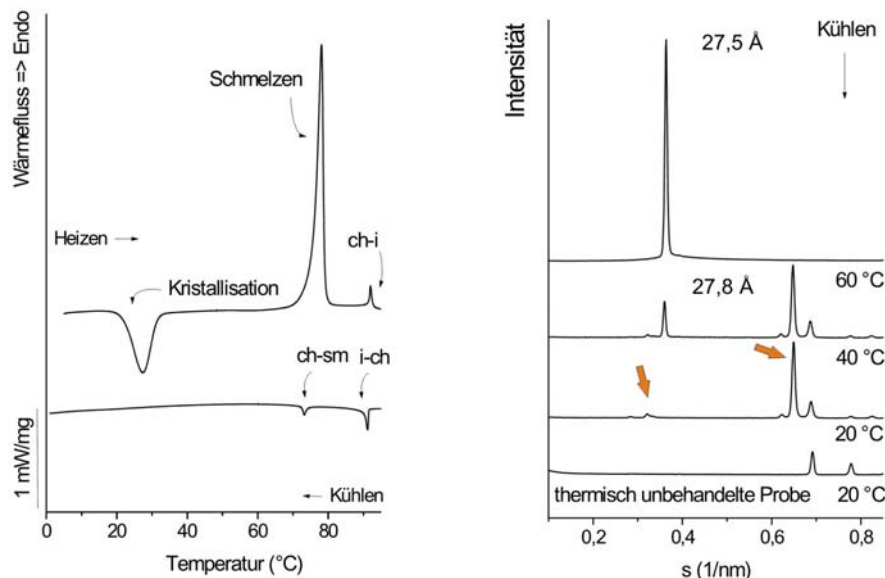


Abbildung 4.1.7: DSC- und Röntgenuntersuchungen von Cholesterylnonanoat. Links: DSC-Heizkurve einer frisch kristallisierten Probe und anschließende Kühlkurve (10 °C/min). Rechts: Röntgenkleinwinkelreflexe im Kühlprozess und einer thermisch unbehandelten Pulverprobe. Die im Text genannten zusätzlichen Reflexe der frisch kristallisierten Substanz sind in der Graphik mit Pfeilen gekennzeichnet.

Cholesteryloleat

Die bei 4 °C gelagerte Substanz schmolz beim Aufheizen in der DSC mit 10 °C/min bei ca. 43 °C (Onset 36,8 °C) mit einer Enthalpie von 63,23 J/g isotrop. Beim nachfolgenden Abkühlen auf 0 °C wurde nur ein flüssigkristalliner Übergang (Onset 32,4 °C, Enthalpie -4,09 J/g) beobachtet. Die Kristallisation trat beim Kühlen auf -5 °C nicht ein, so dass beim erneuten Aufheizen nur der flüssigkristalline Übergang bei ca. 37 °C (Onset 21,5 °C, Enthalpie 4,52 J/g) beobachtet wurde (Abb. 4.1.8). Die DSC-Ergebnisse stimmen gut mit den polarisationsmikroskopischen Beobachtungen überein. Die beobachtete Textur weist auf das Vorliegen der smektischen Phase hin. Die in der Literatur beschriebene monotrope cholesterische Phase, die aus der isotropen Schmelze bei 47,5 °C gebildet wird [Ginsburg et al. 1982, 1984], wurde nicht beobachtet.

Die thermisch unbehandelte, pastöse Substanz zeigte nur einen scharfen Röntgenkleinwinkelreflex geringer Intensität bei $0,5381 \text{ nm}^{-1}$ (Schichtabstand $18,6 \text{ Å}$, 1. Ordnung) neben einem sehr breiten Reflex bei $0,3539 \text{ nm}^{-1}$ (Schichtabstand $28,3 \text{ Å}$). Im Kühlprozess von 40 auf 10 °C wurde der scharfe Röntgenkleinwinkelreflex der smektischen Phase beobachtet. Der Abstand der smektischen Schichten nahm mit sinkender Temperatur von $36,2 \text{ Å}$ (30 °C) auf $36,9 \text{ Å}$ (10 °C) zu (Abb. 4.1.8).

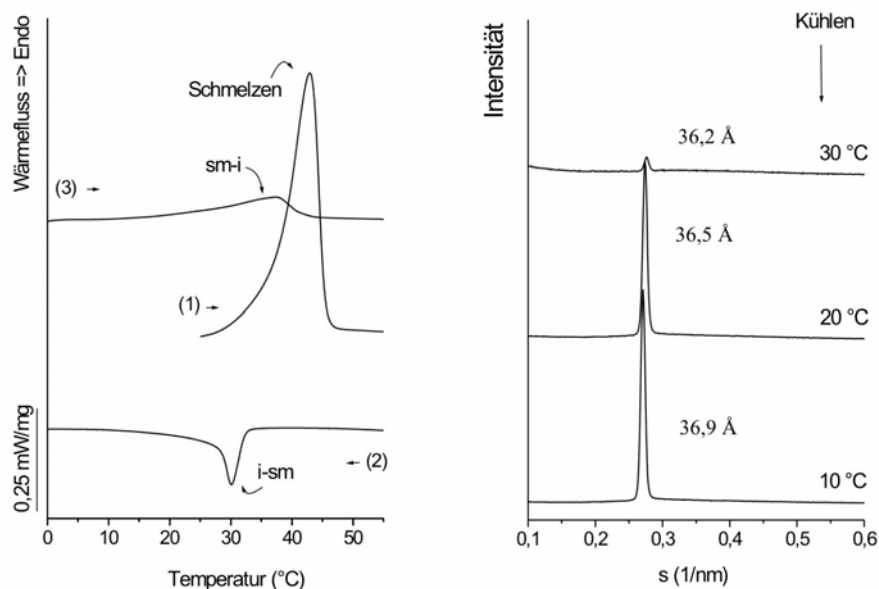


Abbildung 4.1.8: DSC- und Röntgenuntersuchungen von Cholesteryloleat. Links: DSC-Heiz- und Kühlkurven. Die Substanz wurde mit einer Heiz- bzw. Kühlrate von 10 °C/min von 20 auf 65 °C aufgeheizt (1), auf -5 °C abgekühlt (2) und anschließend noch einmal auf 65 °C aufgeheizt (3). Rechts: Röntgenkleinwinkelreflexe der smektischen Phase im Kühlprozess.

4.1.2 Wechselwirkungen von Cholesterylmyristat mit ausgewählten Stabilisatoren

Smektische Nanopartikel, die auf der Basis von Phospholipiden sowie mit Polyvinylalkohol stabilisiert wurden, zeigten Besonderheiten in ihrem Phasenverhalten. Außerdem kam es in diesen Systemen zu Veränderungen des Phasenverhaltens nach längerer Lagerung (Kapitel 4.4). Aus diesem Grund wurden Mischungen dieser Stabilisatoren mit Cholesterylmyristat im nicht dispergierten Zustand untersucht. Für die Untersuchungen wurden 3,2 Teile Phospholipid S100 bzw. 5 Teile Polyvinylalkohol (Mowiol 3-83) mit jeweils 5 Teilen Cholesterylmyristat (m/m) gemeinsam aufgeschmolzen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Mischungen polarisationsmikroskopisch und in der DSC untersucht.

Cholesterylmyristat/Phospholipid-Mischung

Die rekristallisierte Mischung erschien homogen und war leicht gelblich gefärbt. Beim Aufheizen und Abkühlen (5 °C/min) der Mischung im Polarisationsmikroskop wurden die für Cholesterylmyristat typischen Texturen beobachtet. Die Phasenübergangstemperaturen waren leicht zu tieferen Temperaturen verschoben. Im Kontakt mit Wasser kam es zu einem raschen Austritt des Phospholipids aus der kristallisierten Mischung unter Bildung der für Phospholipide typischen Strukturen (Abb. 4.1.9 [Small 1986]).

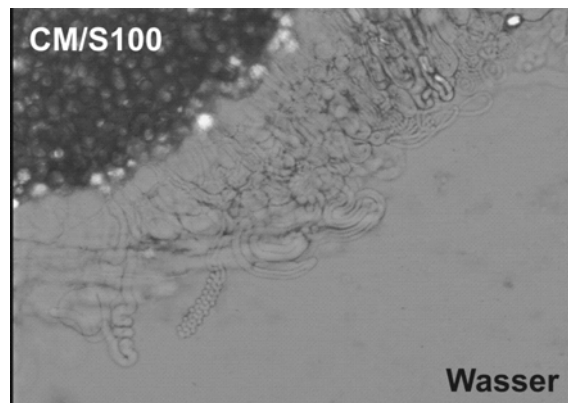


Abbildung 4.1.9: Polarisationsmikroskopische Aufnahme der kristallisierten CM/PL-Mischung nach Kontakt mit Wasser (Raumtemperatur, 15 min, Aufnahme mit 200facher Vergrößerung).

In der DSC (Heiz- und Kühlrate 0,1 °C/min) wurden im Vergleich zu reinem Cholesterylmyristat eine deutliche Verbreiterung und Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergänge zu tieferen Temperaturen beobachtet (Abb. 4.1.10). Das Schmelz- und Kristallisationsverhalten wurde im Gegensatz dazu weniger durch die Anwesenheit des Phospholipids beeinflusst. Vor allem das Kristallisationsereignis war nicht stark verbreitert und kaum zu niedrigeren Temperaturen verschoben (Onset CM: 46,0 °C vs. CM+S100 45,0 °C).

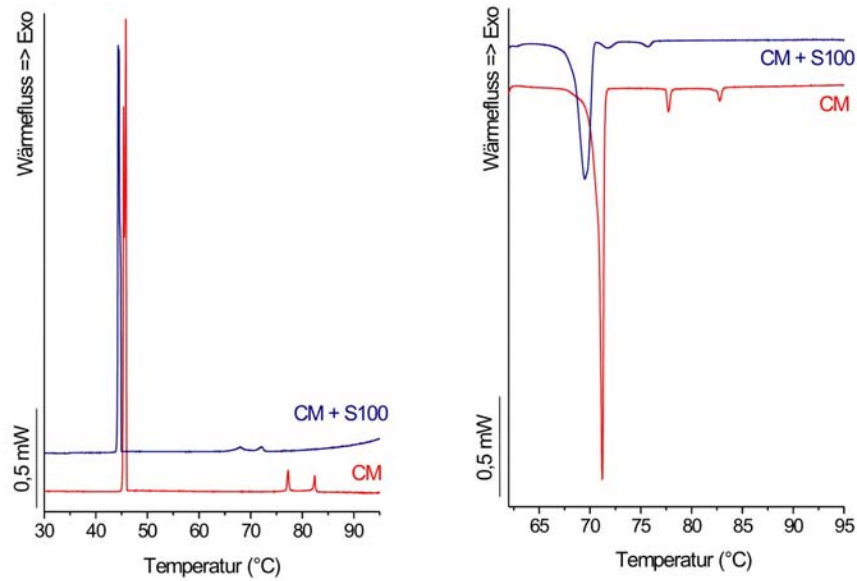


Abbildung 4.1.10: DSC-Kühl- (links) und anschließende Heizkurven (rechts) von CM und der CM/PL-Mischung (Heiz- und Kühlrate 0,1 °C/min).

Cholesterylmyristat/Polyvinylalkohol-Mischung

Die rekristallisierte Mischung erschien nicht ganz homogen. In der weißlichen, leicht durchscheinenden Masse waren einige Klümpchen zu erkennen. Beim Aufheizen und Abkühlen eines homogen erscheinenden Teils der Mischung im Polarisationsmikroskop (10 °C/min) wurden die für Cholesterylmyristat typischen Texturen beobachtet. Die Phasenübergänge waren sehr scharf und nicht deutlich zu tieferen Temperaturen verschoben.

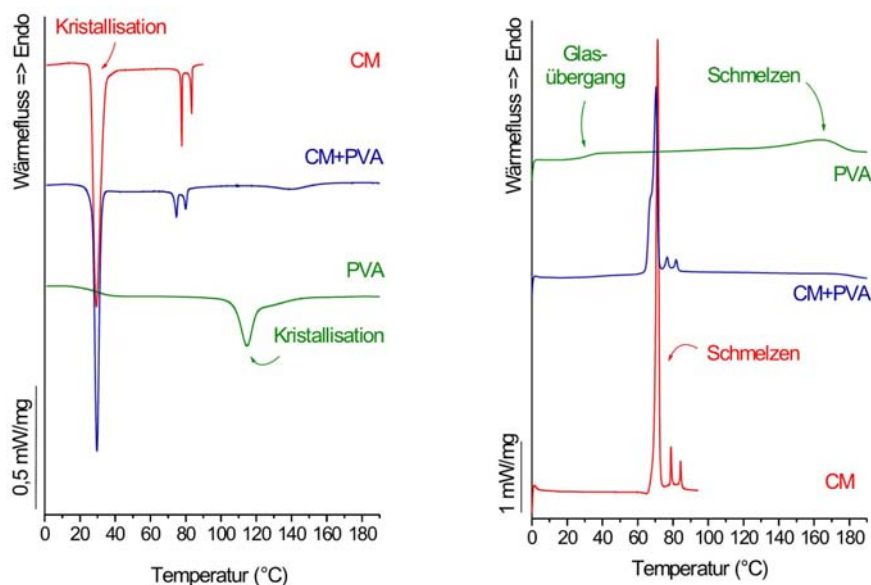


Abbildung 4.1.11: DSC-Kühl- (links) und anschließende Heizkurven (rechts) von CM, PVA und einer CM/PVA-Mischung (Heiz- und Kühlrate 10 °C/min).

Die isotrope Schmelze der Mischung erschien homogen. Im Kontakt mit Wasser wurden keine Veränderungen der rekristallisierten Mischung beobachtet.

Reiner Polyvinylalkohol sowie ein homogen erscheinender Teil der rekristallisierten Mischung wurden in der DSC (10 °C/min) untersucht (Abb. 4.1.11). Für reinen Polyvinylalkohol wurde eine Glasübergangs-Temperatur von 29,6 °C (2. Heizvorgang) gemessen. Ein weiteres, sehr breites Schmelzereignis wurde bei 163,3 °C (Enthalpie 41,60 J/g) beobachtet. Das Kristallisationsereignis mit einer Peak-Temperatur von 114,7 °C (Enthalpie -30,72 J/g) war im Vergleich zum Schmelzpeak schärfer. Die rekristallisierte Mischung zeigte sowohl die Phasenübergänge des Cholesterylmyristats als auch des Polyvinylalkohols. Die Phasenübergänge des Polyvinylalkohols waren allerdings sehr klein und zu höheren Temperaturen verschoben.: Glasübergangstemperatur 38,4 °C, Schmelztemperatur 171,0 °C (2. Heizvorgang) und Kristallisationstemperatur 139,8 °C (Kühlen). Im Kühlprozess konnte kein Glasübergang des Polyvinylalkohols detektiert werden, da er wahrscheinlich von der Kristallisation des Cholesterylmyristats überlagert wurde. Die flüssigkristallinen Phasenübergänge von Cholesterylmyristat waren in der Mischung leicht zu tieferen Temperaturen verschoben, aber im Vergleich zu der Cholesterylmyristat-Phospholipid-Mischung schärfer. Während die Kristallisation nahezu unverändert war, zeigte der Schmelzpeak der Mischung eine Schulter bei tieferen Temperaturen und war auch geringfügig zu tieferen Temperaturen verschoben (Abb. 4.1.11).

4.1.3 Viskositätsuntersuchungen

Es wurde die Viskosität der flüssigkristallinen und isotropen Phasen von Cholesterylmyristat und -nonanoat in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Scherrate im Vergleich zur Viskosität von Sojaöl untersucht.

In temperaturabhängigen Viskositätsmessungen mit einer konstanten Scherrate von 20 s⁻¹ im Kühlprozess (Kühlrate 0,1 °C/min) waren die flüssigkristallinen Phasenübergänge deutlich zu erkennen (Abb. 4.1.12). Die smektische Phase war hochviskos, wobei die Viskosität mit fallender Temperatur stark anstieg. Bei 60 °C wurde eine Viskosität von ca. 5,1 Pa*s für Cholesterylmyristat und 2,6 Pa*s für Cholesterylnonanoat gemessen. Die Viskosität der cholesterischen Phase war deutlich niedriger und mit Ausnahme des Temperaturbereichs im isotrop-cholesterischen Phasenübergang vergleichbar mit der der isotropen Phase (Abb. 4.1.12). Die Viskosität der isotropen Phasen von Cholesterylmyristat (88 °C) und -nonanoat (95 °C) war vergleichbar mit der von Sojaöl (0,04 bzw. 0,05 Pa*s für Cholesterylnonanoat und -myristat; 0,06 für Sojaöl bei 20 °C, Scherrate 20 s⁻¹). Wie Sojaöl zeigte die isotrope

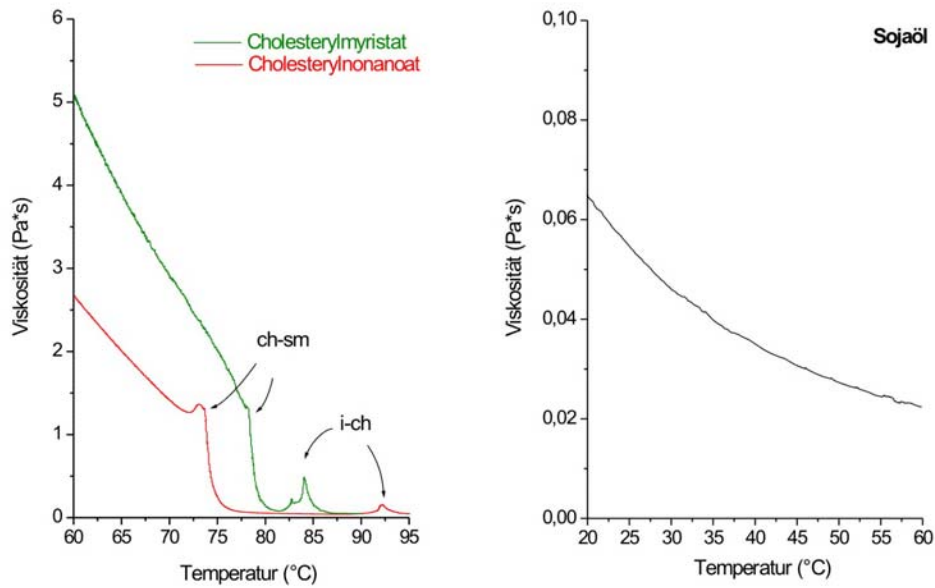


Abbildung 4.1.12: Abhängigkeit der Viskosität von Cholesterylmyristat und -nonanoat (links) und Sojaöl (rechts) von der Temperatur bei einer konstanten Scherrate von 20 s^{-1} und einer Kühlrate von $0,1 \text{ °C/min}$.

Phase der Cholesterolester ein Newtonsches Fließverhalten, d.h. die Viskosität war unabhängig von der Scherbeanspruchung. Die Viskosität der smektischen sowie auch der cholesterischen Phase nahm mit steigender Scherrate ab, wobei die cholesterische Phase empfindlicher gegenüber Scherbeanspruchung war, was vor allem bei Cholesterylmyristat deutlich wurde. Mit steigender Scherrate kam es schnell zu einem Absinken auf eine der isotropen Phase vergleichbaren Viskosität und somit zu einer Zerstörung der cholesterischen

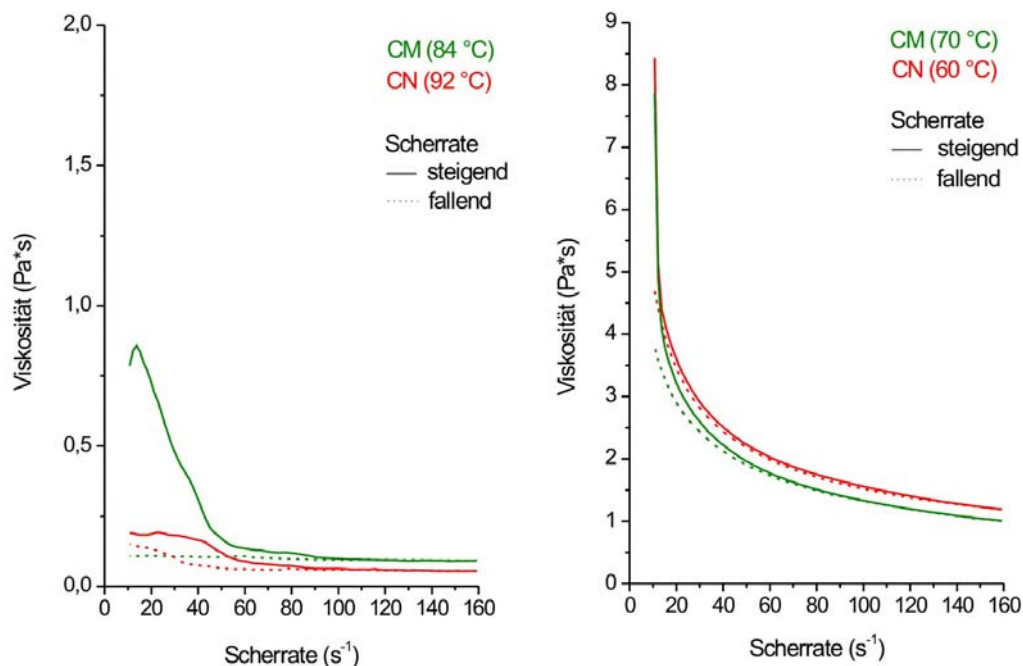


Abbildung 4.1.13: Abhängigkeit der Viskosität der cholesterischen (links) und smektischen (rechts) Phase der Cholesterolester von der Scherrate.

Struktur. Bei anschließender Verringerung der Scherrate auf den Ausgangswert blieb die Viskosität nahezu unverändert bei niedrigen Werten (Abb. 4.1.13). Erst nach längerem Stehen (ohne Scherbeanspruchung) wurde die cholesterische Phase durch ihre leicht bläuliche Färbung wieder erkennbar. Im Gegensatz hierzu nahm die Viskosität der smektischen Phase mit sinkender Scherrate wieder zu, wobei allerdings auch hier der Ausgangswert der Viskosität bei niedrigen Scherraten nicht wieder erreicht wurde (Abb. 4.1.13).

4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

Phasenverhalten der Cholesterolester

Durch ihre besondere Struktur (stark anisometrische Molekülgestalt durch die mit einem rigiden Cholesterolgerüst verknüpfte Fettsäurekette) sind viele Cholesterolester zur Ausbildung thermotroper Mesophasen befähigt. Aufgrund der Wechselwirkungen der rigiden Cholesterolgerüste zwischen den einzelnen Molekülen kommt es nach dem Schmelzen der Substanz zur Ausbildung flüssigkristalliner Phasen [Ginsburg et al. 1984, Small 1986]. Da die Fettsäureketten in den Mesophasen im geschmolzenen Zustand vorliegen, sind die flüssigkristallinen Phasenübergänge (smektisch-cholesterisch und cholesterisch-isotrop) mit einer geringeren Enthalpieänderung verbunden im Vergleich zum Schmelzen der kristallinen Substanz. Auch die nur sehr geringe Unterkühlungstendenz der flüssigkristallinen Phasenübergänge (isotrop-cholesterisch und cholesterisch-smektisch) lässt sich auf die geringe Energiebarriere zwischen der isotropen, cholesterischen und smektischen Phase zurückführen [Small 1986]. Im Gegensatz dazu zeigt die smektische Phase eine starke Unterkühlung, bevor die Kristallisation, die eine Anordnung der Fettsäureketten in einem hochgeordneten Kristallgitter erfordert und mit einer deutlich höheren Enthalpieänderung verbunden ist, einsetzt.

Die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen der Rohmaterialien der vorliegenden Arbeit sind für Cholesterylmyristat und –nonanoat – unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Messbedingungen – in relativ guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Tab. 4.1.3). Stärkere Abweichungen von den Literaturdaten wurden bei Cholesterylpalmitat und –oleat, die eine geringere Reinheit (95%) aufwiesen, beobachtet, insbesondere bei den flüssigkristallinen Phasenübergängen.

Cholesterylmyristat zeigt ein vollständig reversibles Phasenverhalten und bildet sowohl eine smektische als auch eine cholesterische Phase in den Heiz- und Kühlvorgängen. Die smektischen Phasen von Cholesterylpalmitat, -nonanoat und -oleat sind nur bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes der kristallinen Substanz existent. Obwohl Cholesteryl-

nonanoat einen relativ hohen Schmelzpunkt aufweist, zeigte der Ester eine sehr starke Unterkühlung der smektischen Phase, die beim Abkühlen auf Raumtemperatur über einen gewissen Zeitraum stabil blieb.

Für Cholesterylpalmitat sind auch in der Literatur größere Abweichungen im Phasenverhalten beschrieben. So wurde in einer DSC-Studie von Barrall et al. [1967a] in den Heizvorgängen keine cholesterische Phase beobachtet, obwohl der Ester vor den Untersuchungen durch mehrmaliges Umkristallisieren aufgereinigt wurde. Die cholesterische Phase von

Tabelle 4.1.3: Vergleich der DSC-Ergebnisse mit Literaturdaten.

	eigene Messdaten		Barrall et al. 1967a		Davis et al. 1970	
	(5 °C/min)		(5 °C/min)		(1,25 bzw. 2,5 °C/min)	
	Peak	Enthalpie	Peak	Enthalpie	Peak	Enthalpie
	(°C)	(J/g)	(°C)	(J/g)	(°C)	(J/g)
<i>Cholesterylnonanoat</i>						
kristallin-cholesterisch	77,8	42,87	80,7	42,42	77,8	47,88
cholesterisch-isotrop	91,8	1,13	93,0	0,97	91,7	1,05
cholesterisch-smektisch	73,4*	-0,72*	66,0*	-0,46*	74,6*	-0,59*
<i>Cholesterylmyristat</i>						
kristallin-smektisch	71,2	76,03	73,6	78,54	70,5	78,12
smektisch-cholesterisch	78,8	2,40	79,7	2,18	77,8	2,65
cholesterisch-isotrop	84,2	1,95	85,6	1,72	81,8	1,60
<i>Cholesterylpalmitat</i>						
kristallin-cholesterisch	76,4	86,20	76,6	95,34	77,3	94,08
cholesterisch-isotrop	74,2*	-2,85*	70,0*	-1,93*	81,6	1,89
cholesterisch-smektisch	70,0*	-4,02*	64,0*	-2,39*	75,6*	-2,44*
<i>Cholesterylleat</i>						
	eigene Messdaten		Ginsburg et al. 1982			
	(5 °C/min)		(5 °C/min)			
smektisch-cholesterisch	37,3	5,70	42,0	2,35		
cholesterisch-isotrop			47,5	1,05		

Es sind jeweils die Messergebnisse des Heizvorgangs einer vorher frisch kristallisierten Probe bzw. die des darauf folgenden Kühlvorgangs angegeben. Die mit einem Sternchen (*) versehenen Daten wurden im Kühlprozess ermittelt.

Cholesterylpalmitat ist nur über einen sehr geringen Temperaturbereich existent, so dass durch Verbreiterung des Schmelzereignisses – beispielsweise durch eine geringfügige Verunreinigung – der flüssigkristalline Übergang von dem Schmelzereignis überlagert werden kann. In einer anderen DSC-Studie mit unterschiedlichen Präparationen von Cholesterylpalmitat [Vogel et al. 1971] wurde im Heizvorgang einer Präparation auch die smektische Phase beobachtet. Durch eine identifizierte Verunreinigung kam es zu einer Schmelzpunktdepression; die flüssigkristallinen Phasenübergänge wurden jedoch nicht beeinflusst. Erst nach aufwendiger Aufreinigung des Esters wurde das übliche Phasenverhalten mit Bildung nur der cholesterischen Phase in den Heizvorgängen beobachtet. In den DSC-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde beim Aufheizen von Cholesterylpalmitat ein zusätzliches kleines endothermes Ereignis bei ca. 57 °C beobachtet, das bei mehrmaligem Aufheizen reproduzierbar war. Auch in den Röntgenuntersuchungen wurde ein zusätzlicher Röntgenkleinwinkelreflex beobachtet, der beim Aufheizen bei ca. 60 °C verschwand und in den nachfolgenden Kühlprozessen wieder erschien. Es scheint sich hierbei um eine Verunreinigung des Cholesterylpalmitats zu handeln.

Auch die beobachteten Besonderheiten im Phasenverhalten des Cholesteryloleats scheinen durch die geringe Reinheit des Esters bedingt zu sein. In der Literatur werden für Cholesteryloleat zwei monotrope Mesophasen beschrieben [Ginsburg et al. 1982 und 1984], die beim Kühlen aus der isotropen Schmelze gebildet werden. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ester wies in den DSC-Untersuchungen nur einen flüssigkristallinen Phasenübergang auf. Dieser Phasenübergang war sehr breit und wies eine relativ hohe Enthalpieänderung auf. Die Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen und Röntgenuntersuchungen weisen auf eine smektische Phase hin. Verunreinigungen mit anderen Cholesterolestern sowie mit freien Fettsäuren wären denkbar. In einer HPLC-Untersuchung wurden neben dem Cholesteryloleatpeak noch weitere Peaks detektiert, die jedoch nicht näher bestimmt wurden.

Struktur der kristallinen und Mesophasen

Die deutlich unterschiedlichen Röntgenkleinwinkelreflexe der kristallinen Cholesterolester sind auf unterschiedliche Kristallstrukturen zurückzuführen. In der Literatur werden für Cholesterolester drei Kristallformen beschrieben (Abb. 4.1.14 [Sawzik und Craven 1980, Ginsburg et al. 1984]): Monolayer Typ I (Ester mit Fettsäureketten $C_9 - C_{12}$, $C_{16:1}$), Monolayer Typ II (Ester mit Fettsäureketten $C_6 - C_8$, $C_{18:1}$) und eine Bilayer-Struktur (längerkettige Ester mit Fettsäureketten $C_{13} - C_{18}$). Trägt man die Schichtabstände gesättigter Cholesterolester gegen die Anzahl der C-Atome der Fettsäureketten auf, so unterscheiden sich

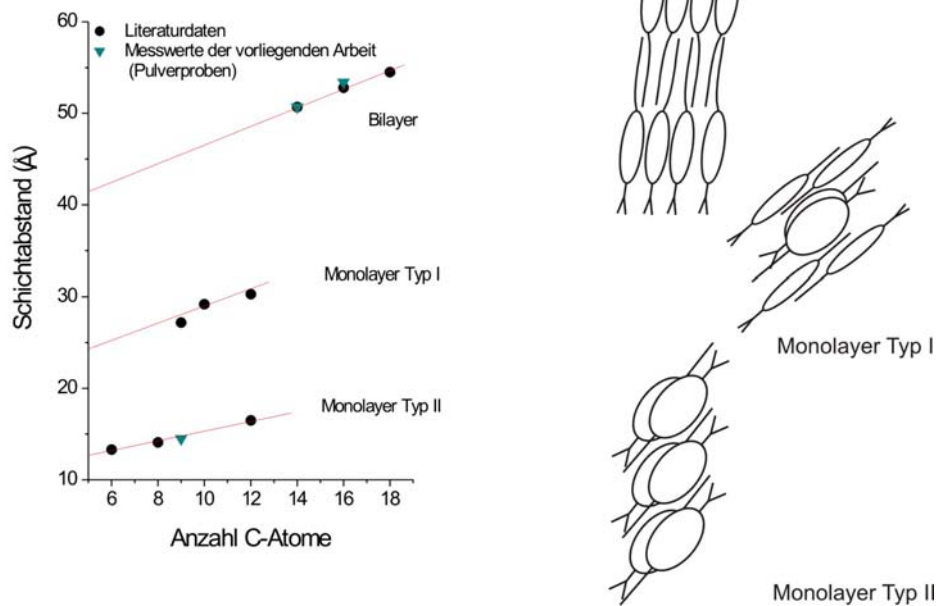


Abbildung 4.1.14: Unterschiedliche Kristallstrukturen von gesättigten Cholesterolestern. Links: Schichtabstand d (Å) der kristallinen Substanzen (Röntgenkleinwinkelreflexe [Ginsburg et al. 1984, Guerina und Craven 1979]) vs. Anzahl der C-Atome der Fettsäureketten. Deutlich sind die drei unterschiedlichen Kristalltypen erkennbar. Rechts: Schematische Darstellung der Anordnung der Moleküle in den unterschiedlichen Kristallstrukturen nach Sawzik und Craven [1980].

die einzelnen Kristallformen deutlich im Anstieg und Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der y-Achse, was auf die unterschiedliche Anordnung der Cholesterolester-Moleküle in den verschiedenen Kristallformen zurückzuführen ist (Abb. 4.1.14).

Die Ergebnisse der Röntgenuntersuchungen sind für Cholesterylmyristat, -palmitat und -oleat in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Tab. 4.1.4). Für Cholesterylpalmitat wurde

Tabelle 4.1.4: Vergleich der Röntgenkleinwinkelreflexe mit Literaturdaten.

	Röntgenkleinwinkelreflexe (Schichtabstand d in Å)			
	kristalline Substanz		smektische Phase	
	eigene Messdaten	Literaturdaten	eigene Messdaten	Literaturdaten
Cholesterylmyristat	50,7	50,7 ¹⁾	33,8 (70 °C)	33,4 (71,8 °C) ²⁾
Cholesterylpalmitat	53,4	52,8 ¹⁾	36,1 (70 °C)	35,5 ¹⁾
Cholesterylnonanoat	14,5	27,2 ³⁾	27,7 (60 °C)	27,3 (63,5 °C) ²⁾
Cholesteryloleat	18,6	18,7 ¹⁾	36,2 (30 °C)	35,5 und 36 ¹⁾ 36 Å (42 °C) ⁴⁾

¹⁾ Ginsburg et al. 1984.

²⁾ Wendorff und Price 1973.

³⁾ Guerina und Craven 1979.

⁴⁾ Ginsburg et al. 1982.

Tabelle 4.1.5: Mittels Einkristall-Röntgenuntersuchungen ermittelte Kristalldaten für Cholesterylnonanoat.

	Raumgruppe	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	Moleküle je Einheitszelle
Barnard und Lydon [1974]	monoklin $P2_1$	14,44	9,33	12,81	95,5	2
Guerina und Craven [1979]	monoklin $P2_1$	27,24	9,183	13,96	91,52	2

ein geringfügig höherer Schichtabstand des Bilayer-Kristalls ermittelt. Im Gegensatz dazu ist der für Cholesterylnonanoat gemessene Schichtabstand (thermisch unbehandelte Probe) von 14,5 Å nicht in Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Für Cholesterylnonanoat wird die Monolayer Typ I-Kristallform mit einem Schichtabstand von 27,2 Å angegeben [Ginsburg et al. 1984, Sawzik und Craven 1980], der in einer Röntgenuntersuchung von Guerina et al. an Cholesterylnonanoat-Einkristallen ermittelt wurde [Guerina und Craven 1979]. Die Arbeiten von Barnard und Lydon [1974] scheinen jedoch auf eine andere Kristallstruktur hinzuweisen. In dieser Studie wurden verschiedene gesättigte Cholesterolester in Einkristall- sowie auch pulverdiffraktometrischen Röntgenmessungen untersucht. Die von Barnard und Lydon gemessenen Einkristall-Daten differieren von den von Guerina und Craven ermittelten (Tab. 4.1.5). In den pulverdiffraktometrischen Untersuchungen fanden Barnard und Lydon ähnliche Beugungsbilder für Cholesterolester mit Fettsäuren mit 6 bis 9 C-Atomen, was auf eine Kristallform des Monolayer-II-Typs auch für Cholesterylnonanoat hinweist. Die Schichtabstände waren in dieser Studie nicht angegeben.

Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Schichtabstand der thermisch unbehandelten Substanz korrespondiert nicht mit dem Monolayer Typ-I-Kristall (Abb. 4.1.14), sondern scheint auf eine Monolayer Typ-II-Kristallform hinzuweisen. Die frisch kristallisierte Substanz zeigte weiterhin zusätzliche Reflexe. Bei dem sehr scharfen Reflex bei 15,5 Å könnte es sich um einen Reflex 2. Ordnung handeln, wobei der Reflex 1. Ordnung bei 31,1 Å nur eine sehr geringe Intensität aufwies. Diese Reflexe scheinen auf eine Monolayer Typ I-Kristallform hinzuweisen, obwohl der gemessene Schichtabstand von 31,1 Å (1. Ordnung) zu groß erscheint. Die Ursachen für das Auftreten der zusätzlichen Reflexe der frisch kristallisierten Substanz sind unklar. Weitere Untersuchungen sind für die Aufklärung einer möglichen Polymorphie der Substanz notwendig. Insbesondere könnten Ergebnisse von Röntgenuntersuchungen im Weitwinkelbereich Hinweise auf unterschiedliche Kristallmodifikationen geben. Da Cholesterylnonanoat in kolloidalem Zustand auch beim Kühlen auf -13 °C nicht kristallisiert und für die vorliegende Arbeit die Eigenschaften der

smektischen Phase von besonderem Interesse waren, die keine charakteristischen Reflexe im Weitwinkelbereich gibt, wurden Röntgenuntersuchungen im Weitwinkelbereich nicht für alle untersuchten Cholesterolester durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten gesättigten Cholesterolester bilden smektische A-Phasen, in denen die Moleküle nahezu senkrecht bezüglich der smektischen Schichten angeordnet sind. Für Cholesteryloleat wird eine smektische C-Phase angenommen, in der die Moleküle in Bezug auf die smektischen Schichten gekippt vorliegen. Die genaue Anordnung der Moleküle in der smektischen Phase ist noch nicht eindeutig geklärt [Ginsburg et al. 1984, Sawzik und Craven 1980].

Der Schichtabstand der smektischen Phase ist deutlich geringer als die aus raumfüllenden Modellen berechnete Moleküllänge, die beispielsweise für Cholesterylmyristat 37,4 Å beträgt [Wendorff und Price 1973]. Des Weiteren ist die Lage des Röntgenkleinwinkelreflexes der smektischen Phase temperaturabhängig: Mit abnehmender Temperatur verschiebt sich der Reflex zu kleineren Winkeln (größere Schichtabstände). Die Verschiebung des smektischen Reflexes wurde detaillierter in den Dispersionen untersucht, da hier die smektische Phase über einen größeren Temperaturbereich existent ist. Das Ausmaß der temperaturabhängigen Reflexverschiebung scheint von der Fettsäurekettenlänge abzuhängen und mit zunehmender Kettenlänge zuzunehmen (Kapitel 4.5). Wendorff und Price [1973] führen die Temperaturabhängigkeit des smektischen Reflexes auf eine teilweise Interpenetration der Moleküle benachbarter smektischer Schichten zurück. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer stärkeren Beweglichkeit der Moleküle und somit zu einer stärkeren Interpenetration der Moleküle zwischen den einzelnen smektischen Schichten. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der smektischen Schichtabstände lassen sich die gemessenen Werte nicht direkt mit den Literaturdaten vergleichen, zumal nicht immer eine Messtemperatur angegeben war. Mit Ausnahme von Cholesterylpalmitat, für das auch für die smektische Phase ein im Vergleich zu den Literaturdaten geringfügig höherer Schichtabstand ermittelt wurde, sind die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten.

Der breite und sehr flache Reflex der cholesterischen Phase kann nicht auf die parallele Ausrichtung der Moleküle sowie auch nicht auf die für die cholesterische Phase charakteristischen Quasischichten der cholesterischen Phase, deren Abstände im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts liegen (Kapitel 2.2), zurückgeführt werden. Es wird angenommen, dass auch in der cholesterischen Phase noch teilweise eine geschichtete Struktur vorliegt [Wendorff und Price 1973].

Wechselwirkungen von Cholesterylmyristat mit Lecithin und Polyvinylalkohol

In der Literatur sind vor allem aus physiologischen Fragestellungen heraus Phasendiagramme von meist ungesättigten Cholesterolestern und Phospholipiden beschrieben [Small et al. 1974, Small und Shipley 1974, Janiak et al. 1979], wobei insbesondere die Einlagerung der Cholesterolester in Phospholipidstrukturen untersucht wurde. Binäre Mischungen von Cholesterolestern und Lecithin zeigen eine vollständige Mischbarkeit der flüssig-isotropen Phasen. Auch die thermotrop flüssigkristallinen Phasen des nicht hydratisierten Lecithins haben eine relativ hohe Aufnahmekapazität für Cholesterolester. Im Gegensatz dazu ist die Aufnahme der Cholesterolester in die lamellare flüssigkristalline Phase des hydratisierten Lecithins gering (2% m/m Cholesteryllinolenat bzw. 3,5% Cholesteryllinoleat, m/m bezogen auf Lecithin [Small et al. 1974]). Hydratisiertes Lecithin war nicht in der flüssigen bzw. flüssigkristallinen Cholesterolester-Phase löslich [Small und Shipley 1974]. Janiak et al. [1979] untersuchten die Wechselwirkungen von Cholesterylmyristat und hydratisiertem Dimyristoyl-Lecithin. Die Ergebnisse weisen auf eine nur sehr geringe Aufnahmekapazität des hydratisierten Lecithins für Cholesterylmyristat hin. Für die DSC-Untersuchungen von Gemischen aus Wasser, Lecithin und Cholesterylmyristat wurden die Lipide im organischen Lösungsmittel gelöst und nach Abdampfen des Lösungsmittels mit Wasser hydratisiert. Mit Ausnahme einer Mischung mit sehr geringem Cholesterolestergehalt – bei der keine Phasenübergänge des Cholesterylmyristats detektiert wurden – wurden sowohl die typischen Phasenübergänge von hydratisiertem Dimyristoyl-Lecithin als auch von Cholesterylmyristat beobachtet. Die Phasenübergangstemperaturen wurden nicht von den Konzentrationsverhältnissen beeinflusst. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Löslichkeit der Phospholipide in Cholesterolestern von Bedeutung ist, sind die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Nicht-hydratisiertes Lecithin konnte durch gemeinsames Aufschmelzen mit dem Cholesterolester in dessen Schmelze gelöst werden. Die rekristallisierte Mischung zeigte in der DSC eine Verschiebung der Phasenübergänge zu tieferen Temperaturen, wobei vor allem die flüssigkristallinen Phasenübergänge sehr breit waren, was auf eine Wechselwirkung des Lecithins insbesondere mit den flüssigkristallinen Phasen des Cholesterylmyristats hinweist. Im Kontakt der rekristallisierten Mischung mit Wasser kam es zu einem raschen Austritt des Phospholipids aus der Mischung. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um den Einfluss der Hydratation auf die Löslichkeit des Phospholipids in den Cholesterolester abzuschätzen.

Auch Polyvinylalkohol (Mowiol 3-83) war nach längerem Erhitzen relativ gut mit der Cholesterylmyristat-Schmelze mischbar. Die rekristallisierte Mischung zeigte jedoch deutlich

die Phasenübergänge sowohl des Cholesterylmyristats als auch des Polyvinylalkohols, wobei die Phasenübergangstemperaturen beider Stoffe beeinflusst wurden. Die flüssigkristallinen Phasenübergänge waren im Vergleich zu der Cholesterylmyristat-Lecithin-Mischung sowohl in der DSC als auch im Polarisationsmikroskop deutlicher und schärfer. Es wäre denkbar, dass in der Mischung kleinere Cholesterylmyristat-Bereiche in einer Polyvinylalkohol-Matrix eingebettet vorliegen. In der Literatur sind bisher keine Wechselwirkungen von Polyvinylalkohol mit Cholesterolestern beschrieben.

Viskositätsuntersuchungen

Die smektische Phase weist eine beträchtliche Viskosität auf, die für beide untersuchten Cholesterolester mit abnehmender Temperatur nahezu linear anstieg. Das Maximum in der Viskositätskurve beim isotrop-cholesterischen Phasenübergang wird auf starke Turbulenzen während des Phasenübergangs zurückgeführt [Sakamoto et al. 1969]. Die scherratenabhängigen Untersuchungen der Viskosität der einzelnen Phasen der Ester können nicht direkt miteinander verglichen werden, da sie bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurden. Es zeigt sich aber für beide Ester ein ähnliches Fließverhalten. Die Viskosität der smektischen und auch der cholesterischen Phase ist stark von der Scherrate abhängig, wobei mit zunehmender Scherrate die Viskosität abnimmt. Die Viskosität der smektischen Phase nahm mit sinkender Scherbeanspruchung wieder zu, wobei die ursprüngliche Viskosität bei niedrigen Scherraten jedoch nicht wieder erreicht wurde. Im Gegensatz hierzu kam es in der cholesterischen Phase zu keinem nennenswerten Anstieg der Viskosität mit fallender Scherrate. Für Cholesterylnonanoat wurde eine geringfügige Viskositätszunahme bei Scherraten $< 10 \text{ s}^{-1}$ beobachtet. Allerdings wurde hier schon zu Messbeginn im Vergleich zu Cholesterylmyristat nur eine niedrige Viskosität gemessen. Sakamoto et al.

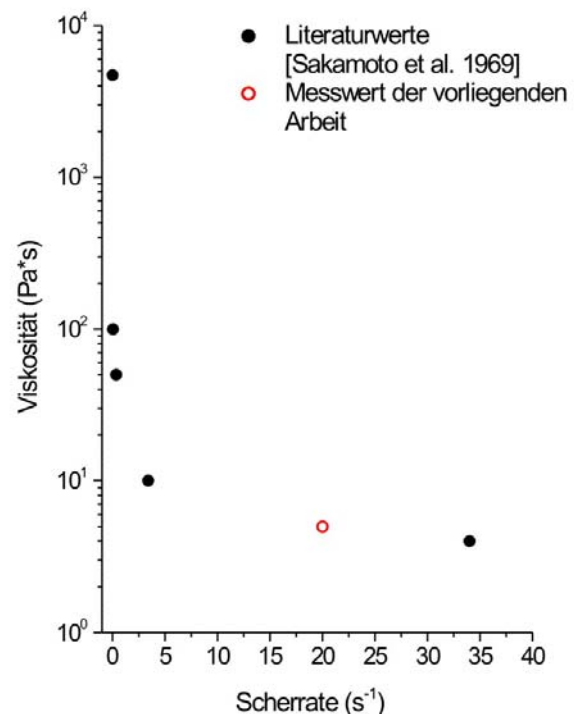


Abbildung 4.1.15: Viskosität der smektischen Phase (60 °C) in Abhängigkeit von der Scherrate. Die Literaturdaten sind einer Graphik der Publikation entnommen.

[1969] untersuchten mit einem Kegel-Platte-Rheometer die Viskosität der smektischen, cholesterischen und isotropen Phase von Cholesterylmyristat in Abhängigkeit von der Temperatur bei unterschiedlichen, auch sehr geringen Scherraten. Die Viskosität der smektischen Phase nahm mit abnehmender Scherrate exponentiell zu (Abb. 4.1.15). Bei einer Scherrate von 34 s^{-1} wurde bei 60 °C eine Viskosität von ca. $4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ gemessen, was in guter Übereinstimmung mit dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten Wert ist.

Obwohl ein direkter Rückschluss auf die Viskosität der kolloidalen smektischen Partikel nicht möglich ist, deuten die Ergebnisse auf eine sehr hohe Viskosität der stark unterkühlten smektischen Phase hin.

4.2 Eigenschaften kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel

Das Phasenverhalten und die Eigenschaften kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel sind im Folgenden exemplarisch anhand ausgewählter Dispersionen im Vergleich zum Rohmaterial dargestellt. Es sei angemerkt, dass das Stabilisatorsystem das Phasenverhalten – insbesondere die Kristallisation – kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel deutlich beeinflusst, was in Kapitel 4.4 beschrieben ist.

4.2.1 Partikelgröße

Durch Schmelzhomogenisation wurden Dispersionen mit mittleren Durchmessern (PCS) von ca. 100 bis 300 nm erhalten (Kapitel 4.3 und 4.4). Die Partikelgrößenverteilungen (LD-PIDS) waren zweigipflig mit Maxima bei ca. 100 nm und bei ca. 300-350 nm (Abb. 4.2.1). Mit steigender mittlerer Partikelgröße (Mean) nahm die Fläche unter dem Peak bei ca. 300-350 nm zu. Die Lage des Maximums bei ca. 100 nm blieb nahezu unverändert.

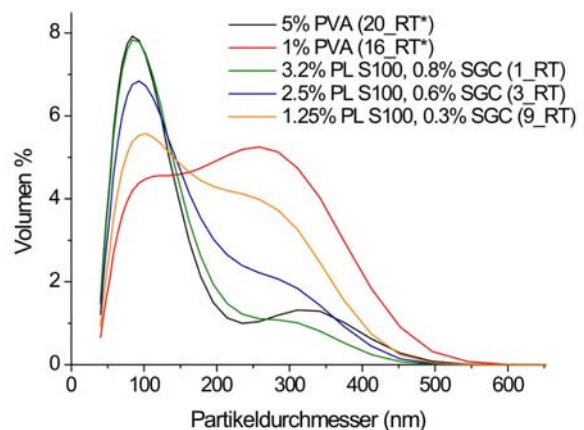


Abbildung 4.2.1: Partikelgrößen-Volumenverteilung (LD-PIDS) ausgewählter Dispersionen.

Mit dem Emulsions-Fällungsverfahren konnten Dispersionen mit mittleren Partikelgrößen (PCS) deutlich unter 100 nm hergestellt werden (Kapitel 4.3).

4.2.2 Phasenverhalten

Kolloidale Cholesterylmyristat-Partikel zeigten in der DSC prinzipiell die gleichen Phasenübergänge wie das Rohmaterial mit Ausnahme der deutlich stärkeren Unterkühlungstendenz der smektischen Phase (Abb. 4.2.2), so dass der smektische Zustand der Nanopartikel auch bei Raumtemperatur erhalten werden kann. Die Phasenübergänge waren kleiner und breiter sowie zu tieferen Temperaturen verschoben. Smektische Nanopartikel (Lagerung bei 23 °C) zeigten beim Aufheizen der Dispersion keinen bzw. nur einen sehr kleinen Schmelzpeak (rekristallisiertes Cholesterylmyristat), so dass der erste beobachtete Phasenübergang einer stabilen Dispersion der von der smektischen in die cholesterische Phase ist (Abb. 4.2.2). Der smektische Zustand der Nanopartikel konnte bei geeigneter Zusammensetzung und Partikelgröße bei Lagerung der Dispersionen bei 23 °C über Monate erhalten werden (Abb. 4.2.2, s.a. Kapitel 4.4). Im Gegensatz dazu kam es bei

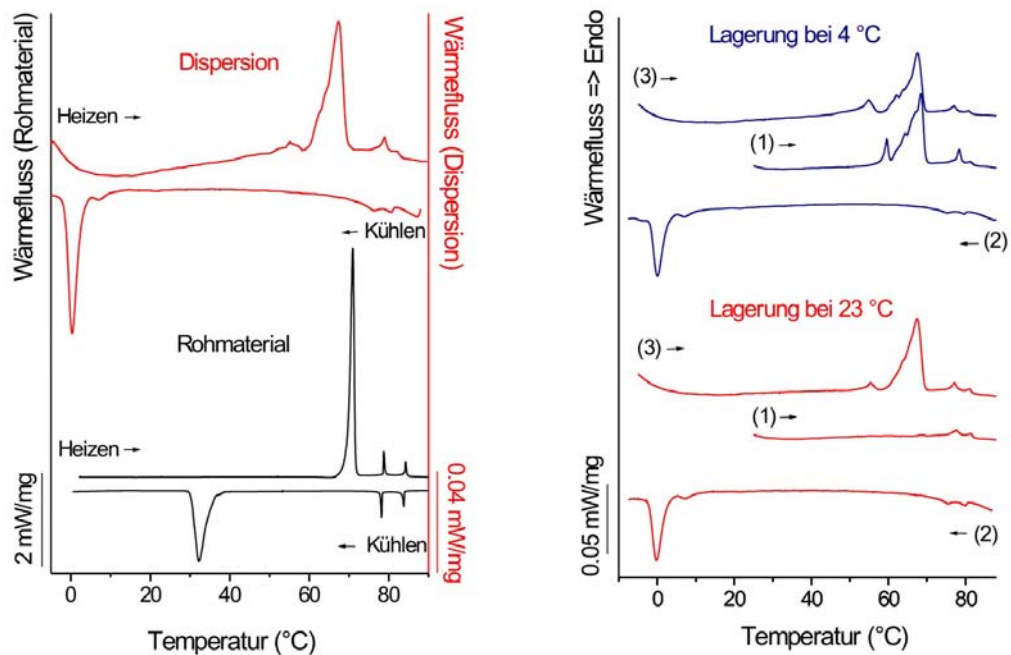


Abbildung 4.2.2: Links: DSC-Heiz- und Kühlkurven einer kolloidalen Dispersion (rot, E_RT) im Vergleich zum Rohmaterial (schwarz). Gezeigt ist der Kühlvorgang der vorher aufgeschmolzenen Probe und der anschließende Heizvorgang (5 °C/min, 1 Monat nach Herstellung). Rechts: DSC-Heiz- und Kühlkurven (2 Monate nach Herstellung, 5 °C/min) einer bei 23 °C (rot) und bei 4 °C (blau) gelagerten Dispersion (1_RT/KS). (1) Heizen der Originalprobe auf 90 °C, (2) Kühlen auf -8 °C und (3) erneutes Heizen auf 90 °C.

Lagerung bei 4 °C zu einer zumeist vollständigen Rekristallisation der Nanopartikel (Abb. 4.2.2).

Die flüssigkristallinen Phasenübergänge waren sehr klein und meist nicht voneinander getrennt, was die Quantifizierung ihrer Übergangsenthalpien ungenau macht. Die Kristallisationsenthalpien der Cholesterylmyristat-Nanopartikel waren – wie auch im Rohmaterial – deutlich geringer als die Schmelzenthalpien im darauf folgenden Heizvorgang. Die Differenz zwischen Kristallisations- und Schmelzenthalpie war abhängig vom Stabilisatorsystem und in allen Dispersionen größer im Vergleich zum Rohmaterial. Während im Rohmaterial die Kristallisationsenthalpie ca. 78% der Schmelzenthalpie des nachfolgenden Heizvorganges ausmachte, lagen die Kristallisationsenthalpien in den Dispersionen im Vergleich zu den Schmelzenthalpien des nachfolgenden Heizvorganges bei ca. 65% und darunter. Die Abhängigkeit der Phasenübergangstemperaturen sowie der Enthalpien von der Scanrate wurde in den Dispersionen nicht untersucht.

4.2.3 Physikochemischer Zustand der Partikel

Smektische Cholesterylmyristat-Nanopartikel (Lagerung bei 23 °C) gaben den für die smektische Phase charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflex und nur eine diffuse Streuung im Weitwinkelbereich (Abb. 4.2.3). Der Kleinwinkelreflex war breiter und von geringerer Intensität als der des Rohmaterials. Die Lage war jedoch vergleichbar unter vergleichbaren Messbedingungen. So wurde bei 60 °C ein Schichtabstand von 34,1 Å sowohl für eine mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Dispersion (1_RT) als auch für das Rohmaterial im Kühlprozess gemessen. Wie im Rohmaterial war der Schichtabstand der smektischen Phase in den Dispersionen temperaturabhängig und nahm mit sinkender Temperatur von 33,5 Å (75 °C) auf 35,1 Å (20 °C) zu (1_RT). Es wurde in den auf der Basis von Phospholipiden sowie mit Polyvinylalkohol stabilisierten Dispersionen keine deutliche Veränderung der Lage des smektischen Röntgenkleinwinkelreflexes während längerer Lagerung der Dispersionen beobachtet (A.3.1).

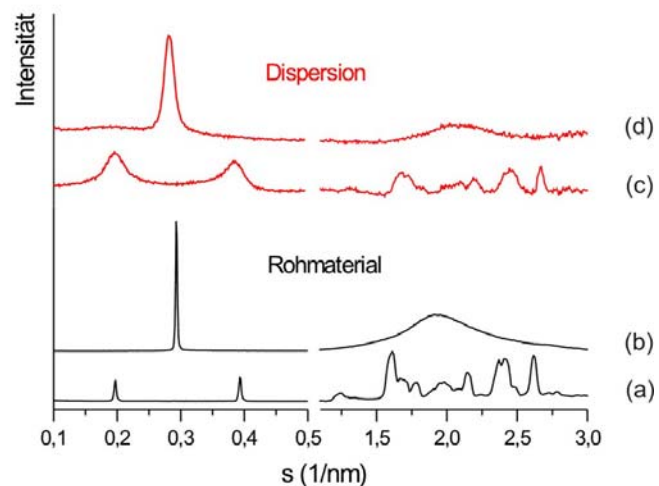


Abbildung 4.2.3: Röntgenklein- und -weitwinkel-diffraktogramme von Cholesterylmyristat im Bulk (schwarz) und in kolloidaler Dispersion (rot). Rohmaterial: Kristallines Pulver (a) bei 20 °C und smektische Mesophase (b) bei 60 °C (Kühlprozess). Dispersion (E_RT) gelagert bei 4 °C (c) und bei 23 °C (d), gemessen bei 20 °C. Die Graphen des Rohmaterials und der Dispersionen sind auf unterschiedlichen Intensitätsskalen dargestellt.

Die bei 4 °C gelagerten Cholesterylmyristat-Nanopartikel zeigten die typischen Röntgenklein- und -weitwinkelreflexe, wie sie auch im kristallinen Rohmaterial beobachtet wurden (Abb. 4.2.3). Es wurde für die bei 4 °C gelagerte Dispersion (1_RT) ein Schichtabstand (1. Ordnung) von 50,8 Å bei 20 °C gemessen, der mit dem des Rohmaterials vergleichbar ist (50,7 Å). Die Reflexe der kolloidalen Dispersionen waren jedoch bedeutend breiter und von geringerer Intensität (Abb. 4.2.3).

4.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Mit Ausnahme der deutlich stärkeren Unterkühlungstendenz der smektischen Phase zeigt Cholesterylmyristat im kolloidalen Zustand das gleiche Phasenverhalten wie im nicht dispergierten Zustand. Die Kristallisation kolloidaler Cholesterylmyristat-Nanopartikel setzt erst unterhalb von Raumtemperatur ein, so dass der smektische Zustand der Partikel über einen längeren Lagerungszeitraum erhalten werden kann, obwohl die smektische Phase unter gleichen Bedingungen im Rohmaterial nicht existent ist. Eine Lagerung der Dispersionen bei 4 °C führt allerdings zur Kristallisation der Cholesterylmyristat-Partikel.

Untersuchungen von Cholesteroler/Stabilisator-Mischungen in der Bulkphase haben gezeigt, dass die starke Unterkühlungstendenz smektischer Nanopartikel nicht auf die Anwesenheit der Stabilisatormoleküle zurückgeführt werden kann (Kapitel 4.1). Das Phänomen der starken Unterkühlung der isotropen Schmelze und Verzögerung der Kristallisation im kolloidalem Zustand ist bekannt [Povey 2001, Coupland 2002], so beispielsweise von kolloidalen Triglycerid-Dispersionen [Bunjes et al. 1996, Westesen et al. 2001, Bunjes und Westesen 2001]. Snow und Philips beschrieben bereits 1990 die deutliche Unterkühlungstendenz von Cholesteroler-Dispersionen mit Partikelgrößen im Submikron-Bereich [Snow und Philips 1990]. Die Stabilität der stark unterkühlen smektischen Phase über einen längeren Lagerungszeitraum wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht.

Die deutlich erhöhte Unterkühlungstendenz im kolloidalen Zustand ist darauf zurückzuführen, dass die Kristallisation im kolloid-dispersen Zustand größtenteils infolge homogener Kristallkeimbildung erfolgt (Abb. 4.2.4). Voraussetzung für die Kristallisation ist die Bildung eines Kristallkeims. In der Bulkphase ist im allgemeinen eine geringe Anzahl von Verunreinigungen vorhanden, an denen Kristallkeimbildung bevorzugt einsetzt (heterogene Keimbildung). Nach der Keimbildung breitet sich die Kristallisation rasch über das gesamte Material aus. Im kolloidalen Zustand finden sich die Verunreinigungen in einer nur sehr geringen Zahl der Partikel wieder, so dass die Mehrheit der Partikel frei von keimbildungsfördernden Verunreinigungen ist (Abb. 4.2.4 [Povey 2001]). Aufgrund dessen ist die Keimbildung erschwert und erfordert einen höheren Grad der Unterkühlung zur Bildung eines Kristallkeims (homogene Keimbildung [Povey 2001, Kraack und Sirota 2000]). Die Kristallkeimbildung kann weiterhin durch Wechselwirkungen zwischen kristallinen und flüssigen Partikeln (interdroplet nucleation) sowie Additive (surface heterogeneous nucleation, beispielsweise durch Emulgatoren mit hohem Schmelzpunkt [Hamada et al. 2002]) gefördert werden [Coupland 2002]. So wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine

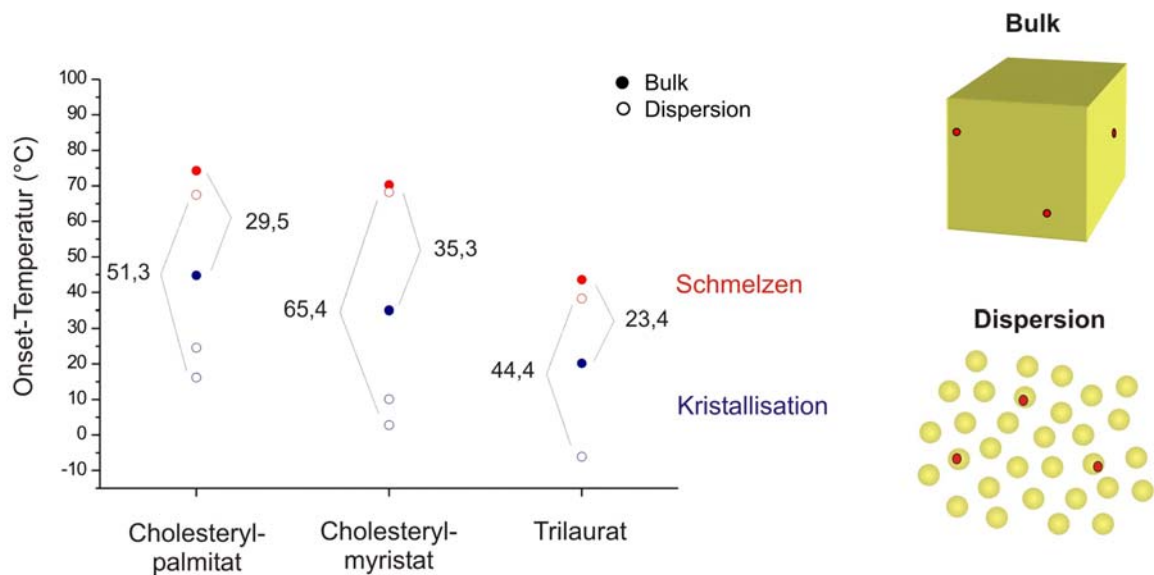


Abbildung 4.2.4: Grad der Unterkühlung im Rohmaterial (geschlossene Symbole) und im kolloidalen Zustand (offene Symbole, Stabilisierung mit S100/NaGC; DSC Heiz- und Kühlrate 5 °C/min) ausgewählter Cholesteroler und eines Triglycerids (links). Die Differenzen zwischen Schmelztemperatur und Kristallisationstemperatur (Unterkühlung) sind in der Graphik angegeben. Schematische Darstellung der Verteilung von Kristallisationskeimen (rot) im Rohmaterial und in kolloidalen Partikeln (rechts). Dispersionen: CP – M3_RT, CM – M1_RT und Trilaurat – BL3_RT (s. A.1.3)

deutliche Abhängigkeit der Kristallisationstendenz kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel vom Stabilisatorsystem beobachtet (Kapitel 4.4).

Der physikochemische Zustand der Partikel kann durch DSC- und Röntgenuntersuchungen nachgewiesen werden. Auch in den Dispersionen wurde der scharfe Röntgenkleinwinkelreflex der smektischen Phase beobachtet. Die Abstände der smektischen Schichten wie auch der Wiederholungsabstand im kristallinen Zustand in den Dispersionen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen des Rohmaterials. Die Reflexe waren jedoch kleiner und breiter, was auf den dispersen Zustand des Cholesterylmyristats zurückgeführt werden kann. Die Quantifizierung des Zustandes der Partikel, die mit Hilfe der DSC aufgrund der sehr kleinen und breiten flüssigkristallinen Phasenübergänge fehlerbehaftet ist, ist mit Hilfe von Röntgenmessungen durch quantitative Auswertung der Intensität des smektischen Reflexes theoretisch möglich, wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

4.3 Einfluss der Herstellungsbedingungen auf die Eigenschaften smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel

Kolloidale Lipid-Dispersionen, wie z.B. Fettemulsionen und Dispersionen fester Lipid-Nanopartikel können durch Hochdruckhomogenisation hergestellt werden [Klang und Benita 1998, Floyd und Jain 1996, Washington und Davis 1988, Bock et al. 1998]. Die Homogenisation von Lipiden, die bei Raumtemperatur im festen Zustand vorliegen, erfolgt üblicherweise bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt des Lipids (Schmelzhomogenisation [Müller et al. 2000]). Vorteil dieser Methode ist, dass die Dispersionen ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel hergestellt werden können. Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Herstellungsparameter (Homogenisator, Temperatur, Druckverlauf, Zeit) auf die Partikelgröße schmelzhomogenisierter Dispersionen untersucht. Für die Herstellung wurden ein Micron-Lab (Kolben-Spalt-Homogenisator) und ein Microfluidizer (Prinzip der Interaktionskammer) verwendet. Für die Untersuchungen wurden Dispersionen gleicher Zusammensetzung (5% Cholesterylmyristat, 3,2% Phospholipid Lipoid S100, 0,8% Natriumglycocholat) unter unterschiedlichen Bedingungen homogenisiert.

Eine alternative Methode zur Herstellung kolloidaler Partikel ist ein Emulsions-Fällungsverfahren [Sjöström et al. 1993a]. Hierbei wird das Lipid in einem nicht mit Wasser mischbaren organischem Lösungsmittel gelöst und diese Lösung mit der wässrigen Phase hochdruckhomogenisiert. Da die Viskosität der lipophilen Phase ausreichend niedrig ist, kann die Homogenisation bei Raumtemperatur bzw. bei leicht verminderter Temperatur erfolgen. Mit dem Emulsions-Fällungsverfahren wurden unterschiedlich zusammengesetzte Dispersionen hergestellt.

Kolloidale Lipid-Dispersionen können des Weiteren mittels Ultraschalldispargierung der geschmolzenen Lipide hergestellt werden. Ginsburg et al. beschreiben für die Herstellung von Cholesteryloleat-Dispersionen als proteinfreie Modell-LDL ein Ultraschallverfahren [Ginsburg et al. 1982]. In eigenen Voruntersuchungen hat sich jedoch gezeigt, dass die Herstellung mit Ultraschall (Sonoplus HD 200, Bandelin, D-Berlin), zumindest für höher konzentrierte Cholesterylmyristat-Dispersionen (1-5%), nicht effektiv war. Die mittlere Partikelgröße lag bei allen hergestellten Dispersionen auch nach länger dauernder Beschallung (> 30 min) bei hohen Temperaturen (90 °C) im Mikrometer-Bereich, so dass das Verfahren nicht für weitere Untersuchungen verwendet wurde.

4.3.1 Herstellung durch Schmelzhomogenisation

Herstellung der Dispersionen mit dem Microfluidizer

Beim Microfluidizer erfolgt die Homogenisation der Rohdispersion in einer Interaktionskammer. Aufgrund der geringen Probenmengen (25-30 ml) wurden alle mit dem Microfluidizer hergestellten Dispersionen kontinuierlich homogenisiert.

Für die Schmelzhomogenisation von Cholesterylmyristat sind hohe Temperaturen notwendig ($> 85\text{ °C}$), was einerseits eine hohe Produktbelastung darstellt und andererseits zu Problemen bei der Homogenisation selbst führen kann. Stieg beispielsweise die Temperatur im Vorratsgefäß des Microfluidizers über $90\text{--}95\text{ °C}$, so kam es zu einem Druckabfall, was darauf zurückzuführen ist, dass die wässrige Phase in der Interaktionskammer in den gasförmigen Zustand übergeht. Aus diesem Grunde wurde neben der Homogenisierung bei $85\text{--}90\text{ °C}$ auch untersucht, ob eine Homogenisation bei tieferen Temperaturen – bei der die Cholesterylmyristat-Partikel in der smektischen Phase vorliegen – effizient und durchführbar ist. Um die Cholesterylmyristat-Partikel der Rohdispersion in den kolloidalen Zustand zu überführen und somit eine Rekristallisation des Cholesterylmyristats während der Homogenisation zu vermeiden, wurden die Dispersionen bei dieser Verfahrensvariante 1 Minute lang mit 700 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$ (isotrope Phase) homogenisiert. Anschließend wurde die Temperatur auf ca. $50\text{--}60\text{ °C}$ (smektische Phase) abgesenkt.

Die Homogenisationsbedingungen der Dispersionen sind in Tabelle 4.3.1 aufgeführt. Nach jeder Homogenisationsminute wurde aus dem Vorratsgefäß des Microfluidizers ca. 1 ml Probe für die Partikelgrößenuntersuchungen entnommen (bei den Dispersionen A_RT, B_RT und C_RT erfolgte keine Probennahme nach der 1. Homogenisationsminute). Bei der Dispersion F_RT kam es aufgrund von Undichtigkeiten zu einem Probenverlust in den letzten

Tabelle 4.3.1: Homogenisationsbedingungen der mit dem Microfluidizer hergestellten Dispersionen.

Dispersion	Homogenisationsbedingungen
A_RT	1 min 700 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$, dann je 1 min 800-900-1000-1100-1200-1300 bar bei $50\text{--}60\text{ °C}$
B_RT	1 min 700 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$, dann je 1 min 1300-1200-1100-1000-900-800 bar bei $50\text{--}60\text{ °C}$
C_RT	1 min 700 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$, dann 6 min 1200-1300 bar bei $50\text{--}60\text{ °C}$
D_RT	je 1 min 700-800-900-1000-1100-1200-1300 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$
E_RT	je 1 min 700-1300-1200-1100-1000-900-800 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$
F_RT	1 min 700 bar, dann 5 min 1200-1300 bar bei $85\text{--}90\text{ °C}$

Homogenisationsminuten, so dass diese Dispersion nur 6 Minuten lang homogenisiert wurde. Mit steigendem Homogenisationsdruck nahm die mittlere Partikelgröße in den Dispersionen ab. Eine Homogenisation bei tieferen Temperaturen (50-60 °C), bei denen sich die Cholesterylmyristat-Partikel im smektischen Zustand befinden, war auch bei Anwendung hoher Drücke nicht effizient (Abb. 4.3.1). Lediglich bei der Dispersion, die über 6 min mit Drücken von 1200-1300 bar homogenisiert wurde (C_RT), lag die mittlere Partikelgröße (PCS z-average) am Ende unter 140 nm. Bei den beiden anderen Dispersionen erfolgte nach Temperaturabsenkung auf 50-60 °C nach der 2. Homogenisationsminute nur noch eine sehr geringfügige Partikelgrößenzerkleinerung von ca. 10 (A_RT) bzw. 3 nm (B_RT). Die Polydispersitätsindices der Dispersionen lagen zwischen 0,12 und 0,14 und waren nicht deutlich von der Homogenisationszeit abhängig (Abb. 4.3.1).

Im Gegensatz dazu erfolgte eine starke Zerkleinerung bei der Homogenisierung bei Temperaturen über 85 °C, vor allem in den ersten Homogenisationsminuten (Abb. 4.3.1). Bei allen drei bei 85-90 °C homogenisierten Dispersionen lag der PCS z-average nach der Homogenisation unter 100 nm. Am effektivsten war die Homogenisation bei anfänglich hohem Druck (E_RT) bzw. bei gleichbleibend hohem Druck (F_RT), wobei sich die Partikelgröße nach ca. 4-5minütiger Homogenisation nicht mehr deutlich änderte bzw. wieder leicht anstieg. Die Homogenisation mit steigendem Druck (D_RT) war nicht so effizient. Eine Partikelgröße unter 100 nm wurde erst nach der 6. Homogenisationsminute erreicht. In allen

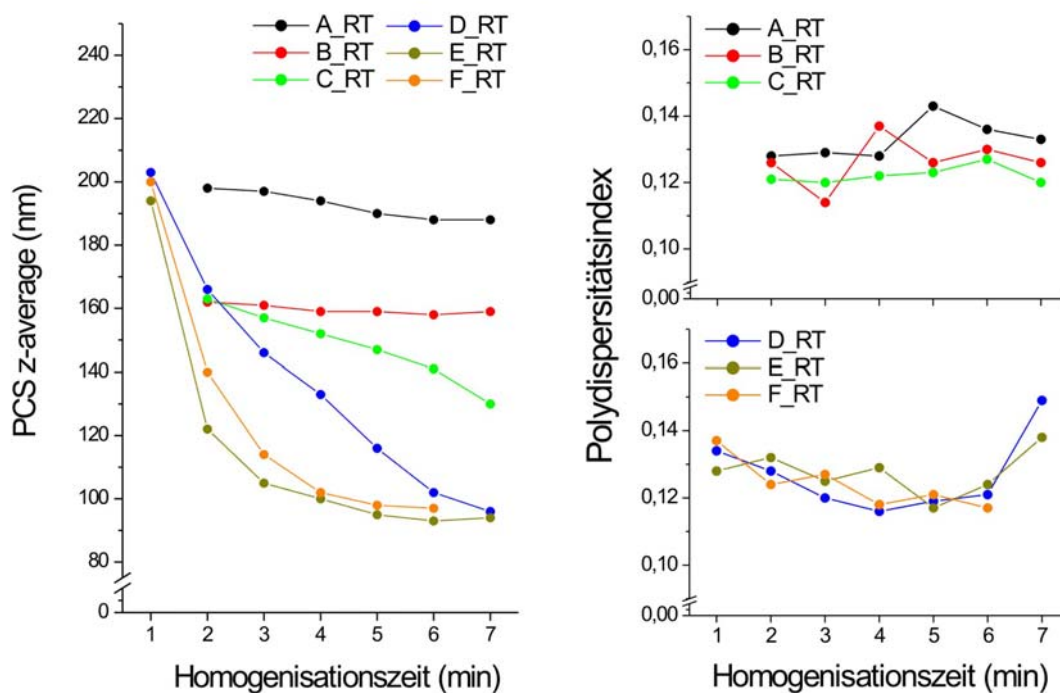


Abbildung 4.3.1: PCS z-Average (links) und Polydispersitätsindices (rechts) in Abhängigkeit von der Homogenisationszeit.

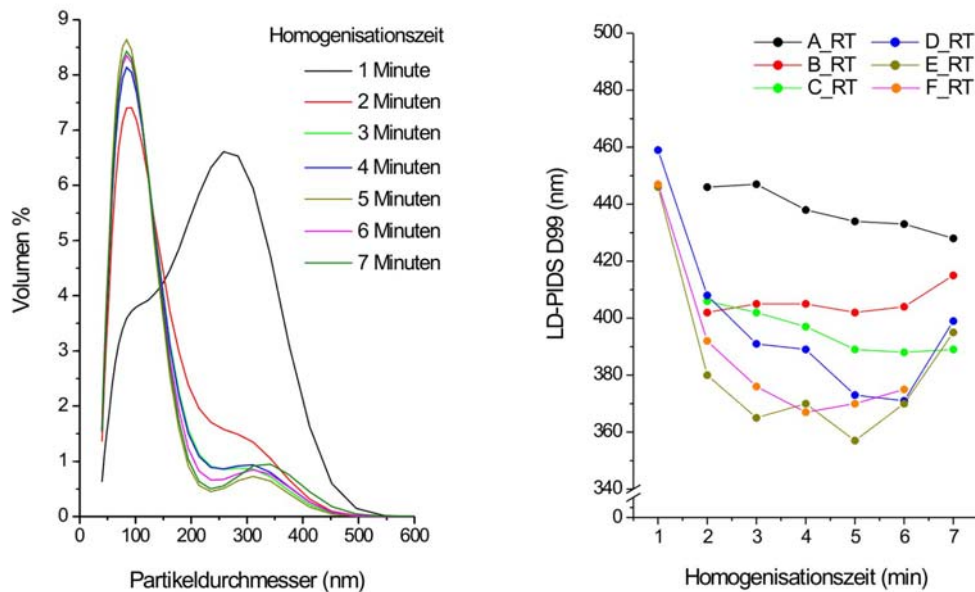


Abbildung 4.3.2: Ergebnisse der LD-PIDS-Messungen. Links: LD-PIDS-Partikelgrößenverteilung einer Dispersion (E_RT) in Abhängigkeit von der Homogenisationszeit. Rechts: D99-Werte in Abhängigkeit von der Homogenisationszeit.

drei Dispersionen, die mit hohen Temperaturen hergestellt wurden, nahm der Polydispersitätsindex während der Homogenisation zunächst leicht ab, um dann – nach der 6. Homogenisationsminute – wieder anzusteigen (Abb. 4.3.1). Die Polydispersitätsindices der Dispersionen lagen zwischen 0,12 und 0,15.

Die LD-PIDS-Messungen sind in guter Übereinstimmung mit den PCS-Messwerten und erlauben ein gutes Verfolgen des Homogenisationsverlaufes. Alle Dispersionen zeigten die typische zweigipflige Partikelgrößenverteilung (Abb. 4.3.2). Schon nach der 1. Homogenisationsminute wurden keine Partikel im μm -Bereich detektiert. Mit zunehmender Homogenisationszeit nahm die Fläche unter dem Peak bei größeren Partikeldurchmessern ab und die Fläche des Maximums bei ca. 100 nm zu. Die D99-Werte nahmen nach der 2. Homogenisationsminute nicht mehr deutlich ab. Nach längerer Homogenisationszeit wurde insbesondere bei Homogenisation bei hohen Temperaturen wieder ein leichter Anstieg beobachtet.

Herstellung der Dispersionen mit dem Micron-Lab

Die Herstellung der Dispersionen erfolgte durch Schmelzhomogenisierung bei Temperaturen über 85 °C und Drücken von 1300 bis 1580 bar mit 5 bzw. 10 Homogenisationszyklen. Um ein ausreichendes Volumen für die Homogenisation aufrechtzuerhalten, wurde die nach jedem bzw. jedem zweiten Homogenisationszyklus (5 bzw. 10 Zyklen) entnommene Probenmenge durch die gleiche Menge auf 90 °C erwärmtes gereinigtes Wasser ersetzt.

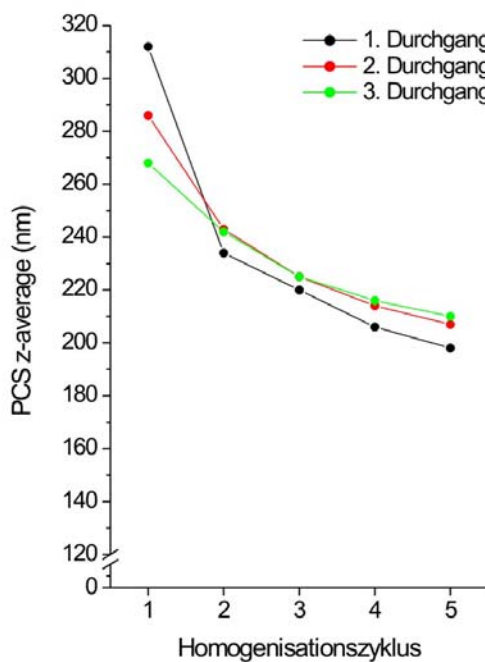


Abbildung 4.3.3: PCS z-average einer mit 5x1300 bar homogenisierten Dispersion (H_RT). Die Rohdispersion (100 g) wurde in drei Ansätzen homogenisiert.

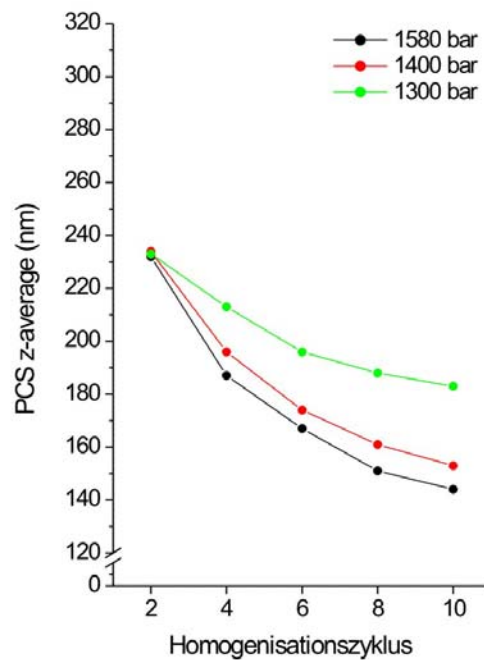


Abbildung 4.3.4: PCS z-average in Abhängigkeit von Homogenisationsdruck (I_RT schwarz, K_RT rot, L_RT grün).

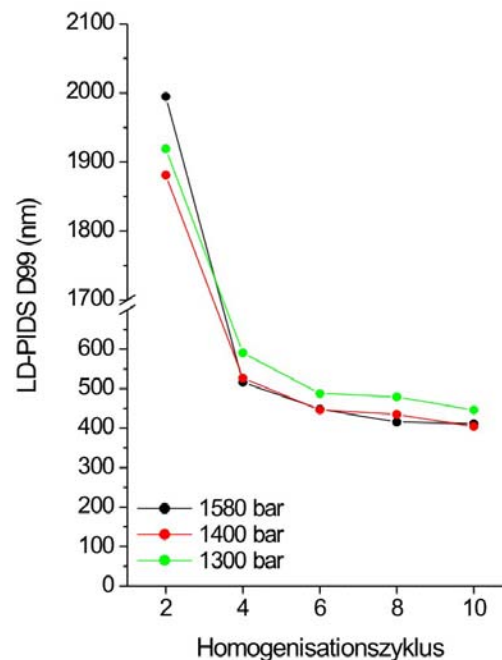
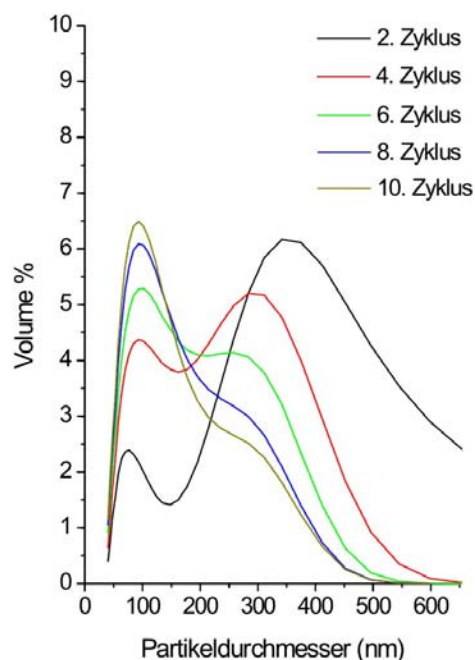


Abbildung 4.3.5: Ergebnisse der LD-PIDS-Messungen. Links: LD-PIDS-Partikelgrößenverteilung einer Dispersion (I_RT) in Abhängigkeit vom Homogenisationszyklus. Rechts: D99-Werte in Abhängigkeit vom Homogenisationszyklus.

Der Micron-Lab arbeitet diskontinuierlich nach dem Kolben-Spalt-Prinzip (Kapitel 3.2). Die Probe wird also in mehreren Einzelschritten homogenisiert. Die Temperierung des Homogenisators erfolgte durch Erwärmen der produktberührenden kompakten Stahlteile (90 °C). Sind viele Homogenisationszyklen notwendig, kann vor allem bei hohen Temperaturen ein Temperaturabfall nicht ausgeschlossen werden. So wurde bei einer Dispersion, die in drei Ansätzen mit je 5 Zyklen mit 1300 bar homogenisiert wurde (H_RT), eine leichte Zunahme des mittleren Partikeldurchmessers beim 2. und 3. Ansatz beobachtet (Abb. 4.3.3). Das könnte auf einen Temperaturabfall und somit eine höhere Viskosität des Matrixlipids zurückgeführt werden. Der mittlere Partikeldurchmesser (PCS) der vereinten Ansätze nach der Herstellung betrug 205 nm mit einem PI von 0,15.

Um Dispersionen mit einer mittleren Partikelgröße deutlich unter 200 nm herzustellen, sind mehr als 5 Homogenisationszyklen mit hohem Druck notwendig. Es wurden drei Dispersionen mit 1580 (I_RT), 1400 (K_RT) und 1300 bar (L_RT) bei über 85 °C mit jeweils 10 Zyklen homogenisiert. Mit steigendem Homogenisationsdruck nahm erwartungsgemäß die mittlere Partikelgröße der Dispersionen ab (Abb. 4.3.4). In allen Dispersionen nahm der Polydispersitätsindex von ca. 0,17 auf 0,14 mit zunehmender Anzahl der Homogenisationszyklen ab. Der Unterschied der mittleren Partikelgrößen nach dem zehnten Homogenisationszyklus war zwischen den mit 1400 und 1580 bar homogenisierten Proben nur gering (153 vs. 144 nm). Die mit 1300 bar hergestellte Dispersion wies eine deutlich höhere mittlere Partikelgröße (PCS) von 183 nm auf. Die effizienteste Zerkleinerung erfolgt vor allem in den ersten Homogenisationszyklen (Abb. 4.3.5). Nach dem zweiten Homogenisationszyklus wurden in den LD-PIDS-Messungen noch Partikel im Mikrometerbereich detektiert, während nach dem vierten Homogenisationszyklus keine Partikel > 1 µm beobachtet wurden.

4.3.2 Herstellung mit dem Emulsions-Fällungsverfahren

Mit dem Emulsions-Fällungsverfahren können Dispersionen mit Partikelgrößen deutlich unter 100 nm hergestellt werden. Zusammensetzung, Homogenisationsbedingungen sowie der PCS z-average nach der Herstellung der Dispersionen sind in Tabelle 4.3.2 aufgeführt. Alle Dispersionen wurden mit dem Microfluidizer hergestellt.

Nach dem Abdampfen des Cyclohexans erschienen alle Dispersionen transparent. Die mit Phospholipid S75 stabilisierte Dispersion war leicht gelblich gefärbt.

Tabelle 4.3.2: Zusammensetzung, Homogenisationsbedingungen und Partikelgröße nach Herstellung der mit dem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellten Dispersionen.

Dispersion	Zusammensetzung (%) ¹⁾			Homogenisations- bedingungen	PCS z-average (nm)	PI
	Cyclohexan	CM	Stabilisator- system			
11_RT	10,0	1,0	1,0 S100 0,25 NaGC	400-1000 bar (steigend) 15-25 °C, 5 min	26	0,13
12_RT	10,0	1,0	1,0 S75 0,25 NaGC	400-1000 bar (steigend) 15-25 °C, 5 min	66	0,27
13_RT	20,0	5,0	2,0 S100 0,5 NaGC	400-1000 bar (steigend) 15-25 °C, 5 min	38	0,11
SE1_RT	20,0	5,0	2,0 S100 0,5 NaGC	900-950 bar 20-30 °C, 3 min	64	0,17
SE2_RT	20,0	5,0	2,0 S100 0,5 NaGC	700-750 bar 15-25 °C, 3 min	49	0,18
SE7_RT	20,0	5,0	2,0 S100 0,5 NaGC	450-950 bar (steigend) 25-30 °C, 3 min	61	0,27
SE9_RT	20,0	5,0	5,0 POL 188	490-970 bar (steigend) 20-25 °C, 3 min	61	0,14

¹⁾ Bezogen auf die Gesamtdispersion im Herstellungsansatz (m/m).

Partikelgröße (PCS, Polarisationsmikroskop) und Lagerstabilität

Die mittleren Partikelgrößen (PCS) lagen zwischen 26 und 66 nm mit Polydispersitätsindices zwischen 0,13 und 0,27 (Tab. 4.3.2). Bei den PCS-Messungen der Dispersionen 11_RT und 12_RT kam es zu größeren Abweichungen zwischen den Einzelmessungen – zum Teil wurden Partikel im µm-Bereich detektiert –, was auf Inhomogenitäten dieser Dispersionen hinweist. Beide Dispersionen zeigten nach Lagerung eine deutliche Veränderung der mittleren Partikelgröße. Während die Phospholipid S100-basierte Dispersion (11_RT) einen höheren PCS z-average zeigte, wurden für mit Phospholipid S75 stabilisierte Dispersion (12_RT) deutlich kleinere mittlere Partikelgrößen gemessen (Abb. 4.3.6).

Obwohl das Verhältnis von Phospholipid zu Cholesterylmyristat in den Dispersionen mit höherem Cholesterolestergehalt (Verhältnis Cholesterolester zu Phospholipid 5:2 m/m) deutlich geringer war als in den niedrig konzentrierten (Verhältnis Cholesterolester zu Phospholipid 1:1 m/m), zeigte vor allem Dispersion 13_RT eine ausgezeichnete Stabilität über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten. Es wurden keinerlei Veränderungen des PCS

z-average beobachtet und die kleinen Polydispersitätsindices von 0,11 (nach Herstellung) bis 0,08 (nach 12monatiger Lagerung) weisen auf eine relativ enge Partikelgrößenverteilung hin. Daraufhin wurden weitere Dispersionen mit gleicher Zusammensetzung sowie eine poloxamer-stabilisierte Dispersion mit gleichem Cholesterylmyristat-Gehalt hergestellt. Die Dispersionen wiesen nach

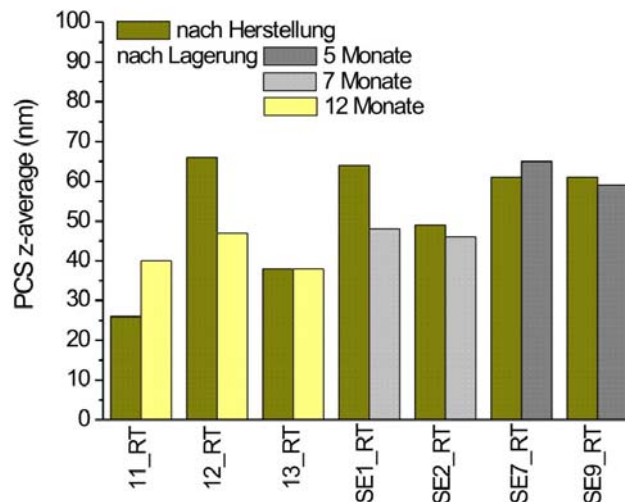


Abbildung 4.3.6: Mittlere Partikelgröße in den Dispersionen nach Herstellung und nach verschiedenen Lagerungszeiträumen (7 bis 12 Monate). Die Zusammensetzung der Dispersionen ist in Tabelle 4.3.2 gegeben.

Herstellung einen größeren PCS z-average auf, was vielleicht auf die niedrigeren Homogenisationsdrücke bei der Herstellung zurückgeführt werden kann. Nur in einer, auf der Basis von Phospholipid S100 stabilisierten Dispersion (SE1_RT) wurden über den Lagerzeitraum von 7 Monaten hinweg größere Unterschiede in den mittleren Partikelgrößen beobachtet. Es kam zu einer Abnahme des PCS z-averages von 64 nm (nach Herstellung, PI = 0,17) auf 48 nm (nach Lagerung, PI = 0,22).

Aufgrund der geringen mittleren Partikeldurchmesser wurden keine LD-PIDS-Messungen durchgeführt, da der Messbereich für diese Proben ungünstig ist (untere Partikelgrößengrenze 40 nm) und für die Messung sehr hohe Probenmengen erforderlich wären. Polarisationsmikroskopisch wurden keine größeren Partikel bzw. Agglomerate beobachtet.

Phasenverhalten (DSC)

In den Heizvorgängen der Original-Dispersionen wurden nur die flüssigkristallinen Übergänge beobachtet. Oft kam es in den DSC-Untersuchungen zu stärkeren Schwankungen der Basislinie, insbesondere bei höheren Temperaturen und bei den Messungen nach Herstellung der Dispersionen.

Die in den DSC-Untersuchungen (Setaram, Heiz-/Kühlrate 0,5 °C/min) beobachteten flüssigkristallinen Phasenübergänge der Dispersionen mit geringem CM-Gehalt (1% m/m im Herstellungsansatz, 11_RT und 12_RT) waren sehr klein und nicht quantifizierbar, zumal in

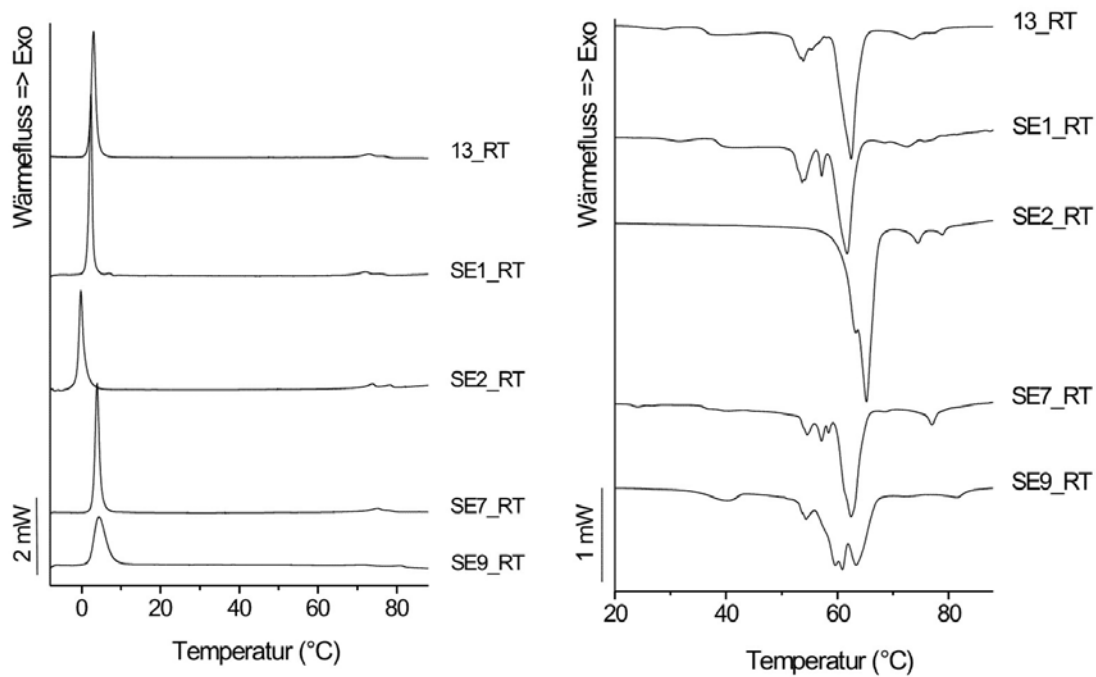


Abbildung 4.3.7: DSC-Kühl- und Heizkurven (0,5 °C/min) der Dispersionen mit 5% CM im Herstellungsansatz (Messung nach Herstellung). Die Proben wurden von 20 °C auf 90 °C aufgeheizt (nicht dargestellt), auf -10 °C abgekühlt (links) und wieder auf 90 °C aufgeheizt (rechts).

diesen Dispersionen deutliche Schwankungen der Basislinie auch nach längerer Lagerung der Dispersionen auftraten. Die auf der Basis von Phospholipid S75 stabilisierte Dispersion (12_RT) zeigte beim Aufheizen und Abkühlen nur einen flüssigkristallinen Übergang bei ca. 67 °C (Peak-Temperatur des 1. Heizens). Für die mit Phospholipid S100 stabilisierte Dispersion wurden zwei flüssigkristalline Übergänge (Peak-Temperaturen des 1. Heizens ca. 76 °C und 79 °C) in den Heiz- und Kühlvorgängen beobachtet. In den höher konzentrierten Cholesterylmyristat-Dispersionen (5% CM m/m im Herstellungsansatz) konnten auch die flüssigkristallinen Phasenübergänge bei sehr geringen Heizraten (Setaram, 0,5 °C/min) quantifiziert werden. Die einzelnen Dispersionen zeigen bei gleicher Zusammensetzung des Herstellungsansatzes Abweichungen in ihrem Phasenverhalten. Häufig war im 2. Heizvorgang nach dem Kühlen auf -10 °C (Rekristallisation) das Schmelzverhalten mehrgipflig (Abb. 4.3.7). Die Dispersion SE2_RT zeigte im Vergleich zu den anderen gleich zusammengesetzten Dispersionen stärkere Abweichungen im Phasenverhalten (nur ein Schmelzpeak, Kristallisation bei tieferen Temperaturen). Die mit Poloxamer stabilisierte Dispersion zeigte flachere flüssigkristalline Phasenübergänge und einen breiteren Kristallisationspeak im Vergleich zu den auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Systemen (Abb. 4.3.7).

Tabelle 4.3.3: Röntgenkleinwinkelreflexe der mit dem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellten Dispersionen.

	Schichtabstand (Å)	Lagerungszeit vor der Messung
11_RT	ca. 35,3 ¹⁾	ca. 2 Monate
12_RT	ca. 35,4 ¹⁾	ca. 2 Monate
13_RT	35,6 und 35,4	ca. 2 und ca. 35 Monate
SE1_RT	34,9	ca. 2 Monate
SE2_RT	35,0	ca. 2 Monate
SE7_RT	34,7	ca. 1 Monat
SE9_RT	34,8	ca. 1 Monat

¹⁾ Die Reflexe waren sehr breit und klein.

In keiner der durch das Emulsions-Fällungsverfahren hergestellten Dispersionen wurde eine Rekristallisation des Matrixlipids über den Lagerungszeitraum der Proben (mindestens 7 Monate) beobachtet.

Zustand der Partikel (Röntgenuntersuchung)

Alle Dispersionen mit höherem Cholesterylmyristat-Gehalt gaben den für die smektische Phase typischen Röntgenkleinwinkelreflex mit einem Schichtabstand der smektischen Phase zwischen 34,7 und 35,4 Å bei 20 °C (Tabelle 4.3.3). Die Schichtabstände der mit dem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellten Dispersionen variierten stärker als die von schmelzhomogenisierten Cholesterylmyristat-Nanopartikeln, für die im Mittel ein Schichtabstand der smektischen Phase bei 20 °C von 35,1 Å gemessen wurde. In den Dispersionen mit sehr geringem CM-Gehalt war der Reflex sehr klein und breit, so dass die Peaklagen nur näherungsweise bestimmt werden konnten.

4.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Schmelzhomogenisation

Die Effizienz der Hochdruckhomogenisation ist von verschiedenen Faktoren abhängig [Jahnke 1998]. In der Literatur finden sich umfangreiche Untersuchungen insbesondere für die Hochdruckhomogenisation kolloidaler Fette-Emulsionen. Bock et al. führten eine sehr umfangreiche Studie zur Hochdruckhomogenisation von mit Soja-Lecithin (Lipoid S75) stabilisierten Sojaöl-Emulsionen mit einem Kolben-Spalt-Homogenisator (Micron-Lab 40, APV-Gaulin) durch [Bock et al. 1998]. Es wurde die Abhängigkeit der Partikelgrößenverteilungen von der Konzentration der Fettphase, vom Stabilisator und von den Homogenisationsbedingungen (Temperatur, Druck, Anzahl der Homogenisationszyklen) untersucht. Washington nutzte für die Untersuchung der Eigenschaften kolloidaler Sojaöl-Emulsionen, die mit Ei-Lecithin (Lipoid E80) stabilisiert wurden, einen Microfluidizer (M110 [Washington und Davis 1988]). In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse der Homogenisationsparameter (Gerät, Druck, Temperatur und Zeit) auf die Effektivität der Homogenisation gleich zusammengesetzter Cholesterylmyristat-Dispersionen (5% CM, 3,2% S100, 0,8% NaGC) untersucht. Weitere wichtige Einflussfaktoren sind jedoch auch die Eigenschaften des Matrixlipides (insbesondere die Viskosität) und die Art und Konzentration des Stabilisatorsystems. Mit steigender Stabilisatorkonzentration nahm die mittlere Partikelgröße in den Dispersionen ab (Kapitel 4.4).

Für die Herstellung von kolloidalen Cholesterylmyristat-Dispersionen mit mittleren Partikeldurchmessern zwischen 100 und 120 nm durch Schmelzhomogenisation sind hohe Homogenisationsdrücke und eine relativ lange Homogenisationszeit erforderlich. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Homogenisation bei Temperaturen dicht über dem cholesterisch-isotropen Phasenübergang (isotrope Schmelze) von Cholesterylmyristat erfolgte (85-90 °C, Bildung der isotropen Schmelze in der Bulkphase bei ca. 85,5 °C) und die Lipidschmelze so eine relativ hohe Viskosität aufwies. Für die Herstellung eignet sich insbesondere ein kontinuierlich arbeitender Microfluidizer, wobei die Homogenisation bei möglichst hohen Temperaturen (> 85 °C) und Drücken (> 1000 bar) für 3 bis 5 min günstig erscheint und zu einer mittleren Partikelgröße der mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Dispersionen von ca. 100 nm führte. Eine längere Homogenisationsdauer führte zu keiner weiteren Abnahme der mittleren Partikelgrößen in den Dispersionen. Zum Teil kam es zu einem leichten Anstieg der Partikelgrößen, was auf eine Überhomogenisierung [Washington und Davis 1988] zurückzuführen ist.

Aufgrund der diskontinuierlichen Arbeitsweise des Kolben-Spalt-Homogenisators war die Effizienz der Homogenisation auch bei Anwendung der höchsten Homogenisationsdrücke im Vergleich zum Microfluidizer geringer. Nach 10 Zyklen mit 1580 bar wies die mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Dispersion eine mittlere Partikelgröße von 144 nm auf. Die Ergebnisse der beiden Homogenisationsverfahren sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da die effektive Homogenisationszeit beim Micron-Lab deutlich geringer war. So benötigt der Homogenisator bei Ansatzmengen von 40 ml (beim Microfluidizer wurde mit Ansatzmengen von 30 ml gearbeitet) für einen Homogenisationszyklus nur wenige Sekunden. Um eine effektive Homogenisationszeit von 1 Minute zu erreichen, wären mehr als 5 Homogenisationszyklen notwendig.

Bei der Homogenisation mit dem Microfluidizer kam es zu einer deutlichen Verdünnung der Dispersionen durch im Leitungssystem zurückbleibende Flüssigkeit von ca. 20% bei einer Ansatzmenge von 30 ml und einer Lipidkonzentration von 5% (s. Kapitel 4.6). Unter der Voraussetzung, dass die im Leitungssystem zurückbleibende Flüssigkeitsmenge immer ungefähr gleich bleibt, würde sich der Verdünnungseffekt bei größeren Ansatzmengen weniger bemerkbar machen. Um eine Verdünnung der Dispersionen ganz auszuschließen, wäre ein Spülen des Microfluidizers mit einer entsprechenden Dispersion nötig. Die Reinigung des Leitungssystems kann nur durch Spülen erfolgen. Das ist zeitaufwendig und birgt die Gefahr einer Kontamination der zu homogenisierenden Proben. Im Gegensatz dazu können die Homogenisatorteile des Micron-Lab leicht und gründlich gereinigt werden, so dass eine Kontamination durch andere Proben bzw. eine Verdünnung ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herstellung kolloidaler Cholesterylmyristat-Dispersionen prinzipiell mit beiden Homogenisator-Typen möglich ist. Für eine ausreichende Partikelzerkleinerung sind hohe Drücke und relativ lange Homogenisationszeiten (3-5 min) bzw. viele Homogenisationszyklen (≥ 10) notwendig. Aufgrund der höheren Effizienz der kontinuierlichen Homogenisation sowie der besseren Temperierbarkeit scheint die Herstellung mit einem Microfluidizer günstiger. Eine Homogenisation bei tieferen Temperaturen, bei denen die Matrixlipide in der smektischen Phase vorliegen, ist aufgrund der hohen Viskosität der smektischen Phase (Kapitel 4.1) nicht effizient und ergibt nur bei Anwendung sehr hoher Drücke über einen längeren Zeitraum (7 min) eine gewisse Partikelzerkleinerung.

Emulsions-Fällungsverfahren

Mit dem Emulsions-Fällungsverfahren können Dispersionen mit sehr kleinen Partikeln hergestellt werden. Sjöström nutzte diese Methode für die Herstellung kolloidaler Cholesterylacetat-Suspensionen, wobei das Cholesterylacetat als schwer wasserlöslicher „Modell-Arzneistoff“ diente. Es wurde der Einfluss verschiedene Faktoren auf die Eigenschaften der kolloidalen Dispersionen untersucht wie z.B. Homogenisationsverfahren [Sjöström et al. 1993a], Einfluss der Art und der Konzentration des Stabilisatorsystems sowie Art des Lösungsmittels [Sjöström et al. 1993a,b] und Lösungsmittelrückstände in den Suspensionen [Sjöström et al. 1993c, 1995]. Nach dem Abdampfen des organischen Lösungsmittels wurden feste Nanopartikel erhalten. Die kolloidalen Cholesterylacetat-Suspensionen zeigten über den Lagerungszeitraum von 30 Tagen in Abhängigkeit vom Stabilisatorsystem zum Teil jedoch eine recht beträchtliche Zunahme der mittleren Partikelgrößen (PCS) [Sjöström und Bergenstahl 1992]. Das Verfahren diente auch zur Herstellung von LDL-ähnlichen Partikeln [Sjöström et al. 1995, Gerke et al. 1996] sowie festen Lipid-Nanopartikeln [Siekman und Westesen 1996].

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Cyclohexan für die Herstellung der Dispersionen eingesetzt. Cyclohexan weist ein gutes Lösungsvermögen für Cholesterylmyristat auf. So konnte 1 Teil Cholesterylmyristat durch kurzzeitige Behandlung mit Ultraschall in 4 Teilen Cyclohexan (m/m) gelöst werden. Die Dispersionen mit geringem Cholesterylmyristat-Gehalt (1% bezogen auf den Herstellungsansatz) zeigten über den Lagerungszeitraum in den Partikelgrößenmessungen größere Differenzen, was auf Inhomogenitäten in den Dispersionen hinweist. Im Gegensatz dazu erschienen die Dispersionen mit höherem Cholesterylmyristat-Gehalt (5% bezogen auf den Herstellungsansatz) stabiler. Die Eigenschaften der Partikel waren allerdings nicht so gut reproduzierbar wie die der schmelzhomogenisierten. So unterschieden sich die Partikelgrößen und auch das Phasenverhalten der Dispersionen zum Teil deutlich voneinander. Die Dispersion, die mit dem geringsten Druck homogenisiert wurde (SE2_RT), zeigte ein von den anderen Dispersionen deutlich abweichendes Phasenverhalten mit nur einem Schmelz- sowie einem zu tieferen Temperaturen verschobenen Kristallisationsereignis. In allen anderen Dispersionen wurde im Heizvorgang nach der Kristallisation ein mehrgipfliges Schmelzverhalten beobachtet. Ein sogenanntes multiples Schmelzverhalten zeigen auch kolloidale Tripalmitat-Partikel. Durch zeit- und temperaturabhängige Röntgenuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei nicht um polymorphe Übergänge handelt, sondern um das aufeinanderfolgende Schmelzen einzelner Partikelgrößenfraktionen, bedingt

durch die unterschiedlichen Dicken der plättchenförmigen Partikel [Bunjies et al. 2000, Unruh et al. 2001]. Da für Cholesterylmyristat keine polymorphen Kristallformen beschrieben sind und die kolloidalen, kristallinen Partikel eine mehr oder weniger stark ausgeprägte plättchenförmige Gestalt aufweisen (Kapitel 4.4), ist das beobachtete multiple Schmelzverhalten wahrscheinlich auf diesen Effekt zurückzuführen. Allerdings war im Vergleich zu den Triglycerid-Dispersionen das multiple Schmelzverhalten der Cholesterylmyristat-Nanopartikel geringer ausgeprägt. So zeigten Dispersionen mit mittleren Partikelgrößen über 100 nm mit Ausnahme der mit Natriumoleat stabilisierten Dispersion kein ausgeprägtes multiples Schmelzverhalten (Kapitel 4.4).

Das Emulsions-Fällungsverfahren ist gut geeignet für die Herstellung kolloidaler Cholesterylmyristat-Dispersionen mit Partikelgrößen deutlich unter 100 nm. Vorteilhaft ist, dass die smektischen Partikel auch über einen sehr langen Lagerungszeitraum nicht kristallisierten. In keiner der mit dem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellten Dispersion wurde über den Lagerungszeitraum von 7 bzw. 12 Monaten rekristallisiertes Cholesterylmyristat nachgewiesen. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode notwendig. So zeigte vor allem eine Dispersion (13_RT) eine ausgezeichnete Lagerstabilität mit keinerlei Veränderungen über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten, während in den anderen Dispersionen mehr oder weniger deutliche Veränderungen der Partikelgrößen beobachtet wurden.

Ein Nachteil dieser Methode, vor allem im Hinblick auf eine parenterale Anwendung der Dispersionen, ist die Verwendung des organischen Lösungsmittels. Es ist wahrscheinlich, dass ein Rest des Lösungsmittels nicht aus den Dispersionen entfernt werden kann. Sjöström fand eine Abhängigkeit des Restlösungsmittelgehalts von der ursprünglichen Konzentration des Cholesterylacetats in dem organischen Lösungsmittel sowie von der Art des Stabilisatorsystems. So wiesen Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden stabilisiert wurden, höhere Restlösungsmittelgehalte auf als mit Tween 80 stabilisierte Systeme [Sjöström et al. 1993c].

4.4 Einfluss des Stabilisatorsystems auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel

Kolloidale Emulsionen und Suspensionen sind aufgrund der hohen Grenzflächenenergie, die sich aus der großen Grenzfläche der dispergierten Phase wegen der geringen Partikelgröße ergibt, thermodynamisch instabile Systeme. Für die Stabilisierung werden amphiphile Stoffe eingesetzt, die sich bevorzugt in Grenzflächen anreichern und so die Grenzflächenenergie herabsetzen. In Abhängigkeit von den Eigenschaften der verwendeten grenzflächenaktiven Stoffe erfolgt die Stabilisierung weiterhin durch elektrostatische (Erhöhung des Zetapotentials, z.B. geladene Emulgatoren) oder sterische Stabilisierung (z.B. amphiphile nichtionische Polymere) bzw. einer Kombination von beidem [Evans und Wennerström 1999]. Das verwendete Stabilisatorsystem kann das Phasenverhalten der dispergierten Lipide, so insbesondere die Kristallisation sowie polymorphe Umwandlungen des Matrixmaterials beeinflussen [Garti und Yano 2001, Hamada et. al. 2002, Bunjes et al. 2003, Ueno et al. 2003, Siekmann 1994]. Des Weiteren werden die Oberflächeneigenschaften der kolloidalen Partikel, die einen großen Einfluss auf das Schicksal der Partikel in vivo haben, durch den verwendeten Stabilisator bestimmt. Beispielsweise kann eine sehr rasche Opsonierung und Aufnahme injizierter Lipid-Nanopartikel in Makrophagen durch eine Stabilisierung mit Polymeren umgangen und somit eine längere Zirkulationszeit erreicht werden [Illum et al. 1989, Liu und Liu 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Stabilisierung der Dispersionen neben Phospholipiden und Phospholipid/Gallensalz-Gemischen verschiedene andere Stabilisatoren wie Polymere, Peptide bzw. Proteine sowie einige niedermolekulare Tenside eingesetzt (Kapitel 3.1). Da der unterkühlte smektische Zustand der Nanopartikel metastabil ist, sind insbesondere Untersuchungen des Kristallisationsverhaltens sowie der Rekristallisationstendenz der Nanopartikel während der Langzeitlagerung für die Entwicklung lagerstabiler smektischer Nanopartikel erforderlich. Cholesterylmyristat wurde aufgrund seines günstigen Phasenverhaltens (reversibles Phasenverhalten und Kristallisation der Nanopartikel oberhalb von 0 °C) als Modellester für die Untersuchungen ausgewählt. Es wurden hierzu 5%ige Cholesterylmyristat-Dispersionen verwendet, die durch Schmelzhomogenisation mit dem Microfluidizer hergestellt wurden. Die Ergebnisse der DSC- und Röntgenuntersuchungen ausgewählter Dispersionen sind im Anhang (A.2.2 und A.3.3) aufgeführt.

4.4.1 Phospholipide und Phospholipid-Gallensalz-Gemische

Es wurden gereinigte Soja- und Ei-Phospholipide allein oder in Kombination mit Natriumglycocholat in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Tabelle 4.4.1). Für die Herstellung der ersten Dispersionen (Chomy_PLGC1,2_RT sowie 1-6_RT und 9-10_RT) wurde das Phospholipid in der Cholesterolesterschmelze gelöst. Um eine lange thermische Belastung der Lipide zu vermeiden, wurde für die Herstellung aller anderen Dispersionen das Phospholipid in der wässrigen Phase dispergiert (s.a. A.1.1 und A.1.2).

Tabelle 4.4.1: Zusammensetzung und Konzentration des Stabilisatorsystems der phospholipid-basierten Dispersionen.

Stabilisatorsystem	Konzentration bezogen auf die Gesamtdispersion (% m/m)	Dispersionen ¹
PL S100	3,2	5_RT
PL S75	3,2	6_RT
PL S100 + NaGC	3,2 + 0,8	1_RT, A-F_RT, H_RT, M1_RT
PL S75 + NaGC	3,2 + 0,8	2_RT
PL E80 + NaGC	3,2 + 0,8	S22_RT
PL S100 + NaGC	2,5 + 0,6	3_RT
PL S75 + NaGC	2,5 + 0,6	4_RT
PL S100 + NaGC	1,25 + 0,3	9_RT
PL S75 + NaGC	1,25 + 0,3	10_RT

Alle Dispersionen enthielten als Matrixlipid Cholesterylmyristat (5% m/m, bezogen auf die Gesamtdispersion).

Partikelgröße, makroskopisches Aussehen und Lagerstabilität

Durch Schmelzhomogenisation wurden feine Dispersionen mit mittleren Partikelgrößen zwischen 94 und 200 nm und Polydispersitätsindices zwischen 0,11 und 0,14 erhalten. Die mit Phospholipid S75 und E80 stabilisierten Dispersionen wiesen eine leicht gelbliche Färbung auf. Mit steigender Stabilisatorkonzentration nahm bei vergleichbaren Herstellungsbedingungen die mittlere Partikelgröße in den Dispersionen ab (Abb. 4.4.1). Die Kombination des Phospholipids mit einem Gallensalz war effektiver hinsichtlich der erreichbaren Partikelgröße als die Stabilisierung mit Phospholipiden alleine. Die Emulgierung mit Ei-Lecithin (E80) scheint weniger effektiv im Vergleich zu Soja-Lecithin zu sein (Abb. 4.4.1). Die Partikelgrößenverteilung (LD-PIDS-Volumenverteilung) war bei allen Dispersionen zweigipflig mit einem Hauptmaximum bei ca. 100 nm und einem zweiten, meist als Schulter erscheinenden Maximum bei ca. 300 nm sowie D99-Werten < 420 nm.

¹ Es sind hier nur die Dispersionen aufgeführt, die in diesem Kapitel besprochen werden.

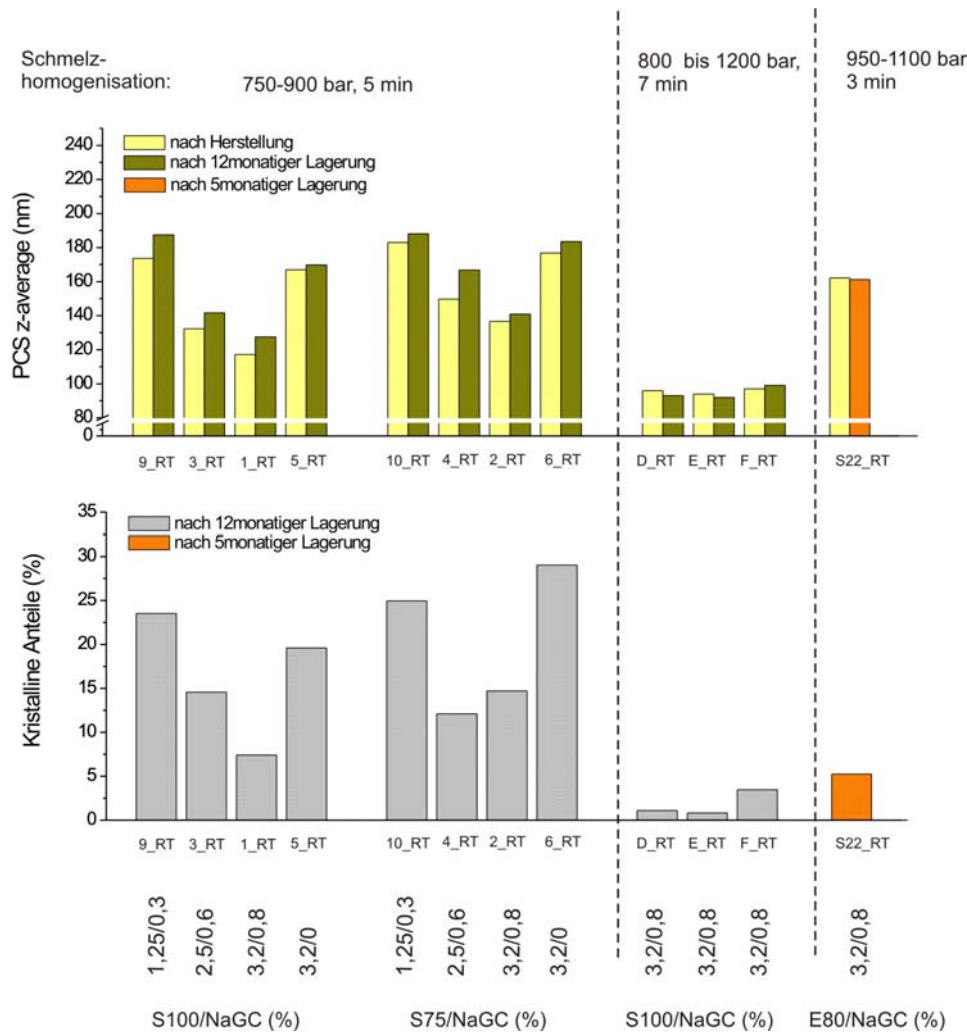


Abbildung 4.4.1: Partikelgröße nach Herstellung und nach Lagerung (oben) sowie rekristallisiertes CM in den Dispersionen nach Lagerung (unten).

Über den Lagerungszeitraum wurde in den Dispersionen mit einem PCS z-average > 100 nm ein geringfügiger Bodensatz beobachtet, der sich durch manuelles Schütteln leicht redispergieren ließ. In diesen Dispersionen kam es über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten zu einer recht deutlichen Rekristallisation des Matrixlipids (Abb. 4.4.1), so dass der Bodensatz wahrscheinlich auf

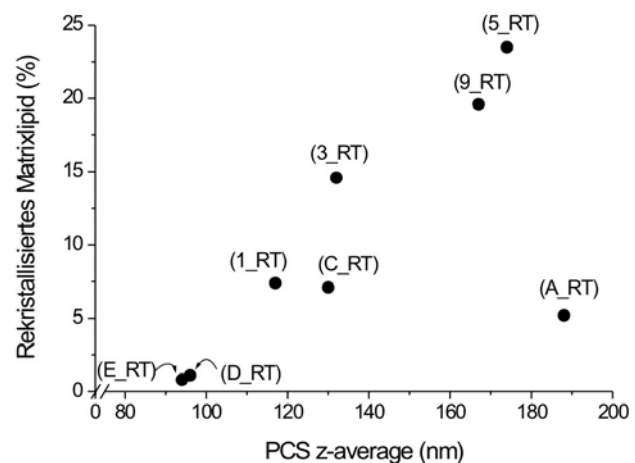


Abbildung 4.4.2: Anteil von kristallinem CM nach 12monatiger Lagerung in Abhängigkeit von der mittleren Partikelgröße (Stabilisierung auf der Basis von PL S100, s. Tab. 4.4.1).

rekristallisierte Partikel zurückgeführt werden kann. Weiterhin wurde in den mit Soja-Lecithin (S100 und S75) stabilisierten Dispersionen über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten eine leichte Zunahme der Partikelgröße beobachtet (Abb. 4.4.1). Obwohl keine direkte Korrelation zwischen Partikelgrößenwachstum und kristallinen Anteilen in den Dispersionen beobachtet wurde, könnte die Zunahme der gemessenen Partikelgröße wenigstens zum Teil durch die Anwesenheit kristalliner Partikel in den Dispersionen erklärt werden. Kristalline Cholesterylmyristat-Nanopartikel besitzen eine anisometrische Gestalt (s.u. Ultrastruktur), weshalb in den PCS-Messungen ein scheinbar höherer z-average erhalten wird. So wurden für kristalline Cholesterylmyristat-Partikel (im Kühlschrank gelagerter Teil der Dispersionen) größere mittlere Partikeldurchmesser (PCS) gemessen (Kapitel 4.10). Das Ausmaß der Rekristallisation der Nanopartikel während Langzeitlagerung scheint insbesondere auch von der Partikelgröße abzuhängen (Abb. 4.4.2). Nur in den Dispersionen mit sehr kleinen Partikeln (PCS z-average < 100 nm, D_RT, E_RT, F_RT) war der rekristallisierte Anteil nach 12monatiger Lagerung $\leq 1\%$.

Phasenverhalten

Das Phasenverhalten von Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden stabilisiert wurden, war sehr komplex und von mehreren Faktoren abhängig. In Abbildung 4.4.3 sind die typischen Heiz- und Kühlkurven phospholipid-stabilsierter Dispersionen gezeigt. Beim Aufheizen (5 °C/min) der Dispersionen, die mit Phospholipid und Gallensalz stabilisiert wurden, wurde bei ca. 78-79 °C die cholesterische Phase gebildet, die bei ca. 81-83 °C isotrop schmolz (Abb. 4.4.3). Die

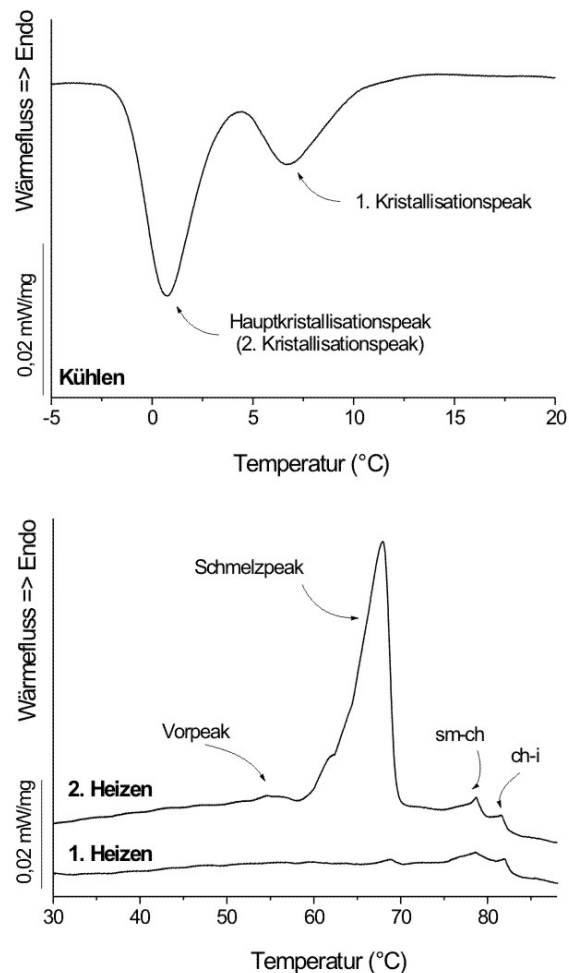


Abbildung 4.4.3: DSC Kühl- (oben) und Heizkurven (unten) einer auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Dispersion (3_RT: 2,5% S100, 0,6% NaGC). Die Dispersion wurde mit 5 °C/min auf 90 °C aufgeheizt, auf -8 °C abgekühlt und noch einmal auf 90 °C aufgeheizt. Messung nach Herstellung der Dispersion.

flüssigkristallinen Phasenübergänge waren sehr klein und flach und nicht vollständig voneinander getrennt, was die Bestimmung der Phasenübergangsenthalpien ungenau macht. Beim nachfolgenden Abkühlen (5 °C/min) wurde die cholesterische Phase bei ca. $81\text{--}82\text{ °C}$ und die smektische bei ca. $77\text{--}79\text{ °C}$ gebildet. In allen Dispersionen wurde ein zweigipfliges Kristallisationsgeschehen beobachtet, das erst unterhalb von 20 °C einsetzte. In Röntgenuntersuchungen an ausgewählten Dispersionen wurden im Kühlvorgang nur die für die kristalline wie auch smektische Phase charakteristischen Röntgenklein- und weitwinkelreflexe beobachtet, so dass ein polymorphes Verhalten als Ursache für das zweigipflige Kristallisationsverhalten ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.4.4).

Das Schmelzereignis beim Aufheizen der kristallisierten Nanopartikel (5 °C/min) war sehr breit und vor dem eigentlichen Hauptpeak bei ca. $68\text{--}69\text{ °C}$ wurde in allen Dispersionen ein kleineres endothermes Ereignis bei ca. $54\text{--}55\text{ °C}$ beobachtet (Abb. 4.4.3). In den Dispersionen, die allein mit Soja-Phospholipiden stabilisiert wurden, wurde in den DSC-Messungen nach Herstellung der Dispersionen nur ein flüssigkristalliner Übergang mit einem breiten Plateau während der Heizvorgänge beobachtet (Abb. 4.4.5), wobei die Enthalpie des Übergangs gut mit der Summe der Enthalpien der Einzelübergänge der mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Dispersionen übereinstimmte. Im Kühlvorgang waren beide flüssigkristallinen Phasenübergänge deutlich erkennbar (Abb. 4.4.5). Beim Schmelzen

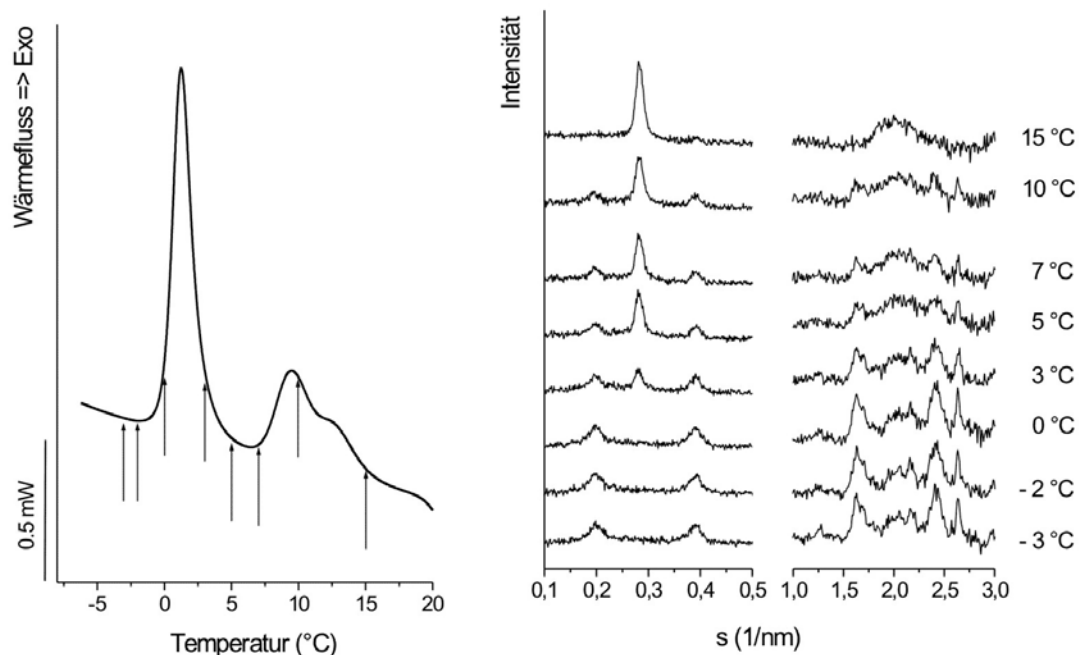


Abbildung 4.4.4: DSC-Kühlkurve (links, $0,5\text{ °C/min}$, 3 Monate n.H.) und Röntgenklein- und -weitwinkelreflexe (rechts, $0,1\text{ °C/min}$, 2 Monate n.H., jeweils 1minütige Messungen) einer mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Dispersion (3_RT: 2,5% S100, 0,6% NaGC) im Kühlprozess. Die Temperaturen der Röntgenmessungen sind in der DSC-Graphik mit Pfeilen gekennzeichnet.

der kristallisierten Nanopartikel wurde auch in den allein mit Phospholipiden stabilisierten Dispersionen ein kleiner Peak vor dem eigentlichen Schmelzpeak beobachtet, dessen Phasenübergangstemperatur geringfügig höher war (60-62 °C, Abb. 4.4.5).

Das Phasenverhalten, insbesondere das Kristallisationsverhalten, veränderte sich während des Lagerungszeitraums von 12 Monaten. In den Dispersionen mit höherer Stabilisatorkonzentration der mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Dispersionen (3_RT: 2,5% S100, 0,6% NaGC; 1_RT: 3,2% S100, 0,8% NaGC und 2_RT: 3,2% S75, 0,8% NaGC) kam es mit zunehmender Lagerungszeit zu einer deutlichen Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergänge zu niedrigeren Temperaturen (Abb. 4.4.6). In den Dispersionen, die allein mit Phospholipiden stabilisiert wurden (5_RT: 3,2% S100, 6_RT: 3,2% S75) kam es zu einer Auftrennung der flüssigkristallinen Phasenübergänge in den Heizvorgängen, wobei die Phasenübergangstemperaturen sich über den weiteren Lagerungszeitraum nicht deutlich veränderten. Die Peak-Temperaturen des Schmelzvorganges änderte sich in den Dispersionen nur geringfügig (Abb. 4.4.6).

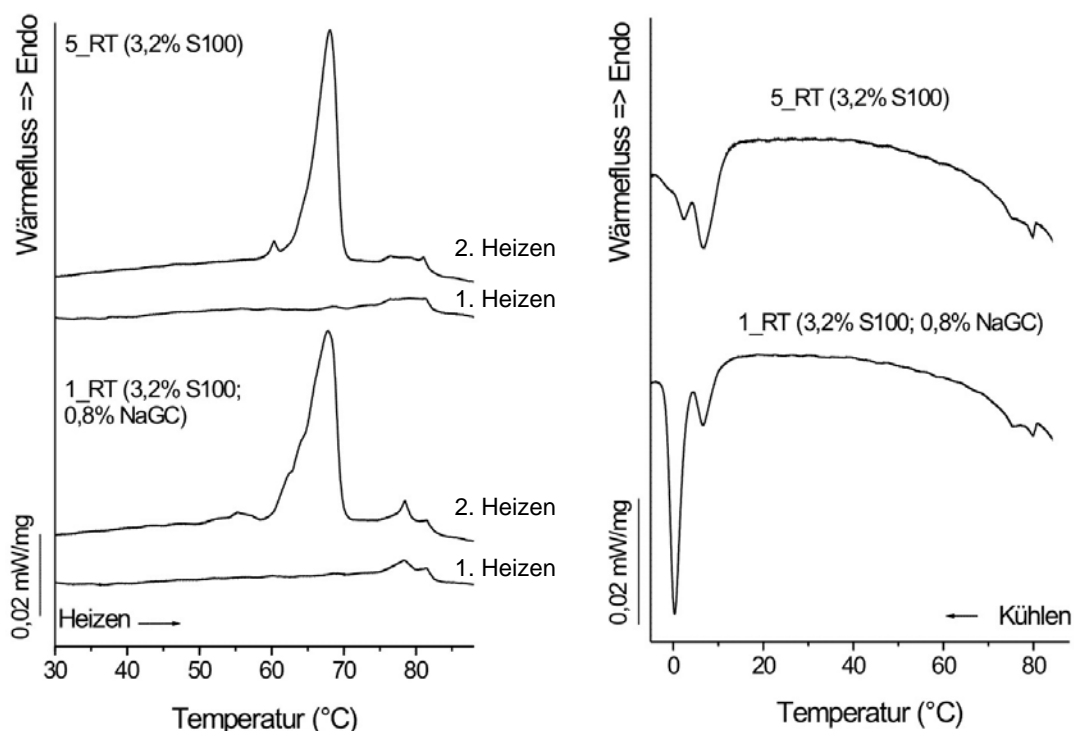


Abbildung 4.4.5: DSC-Heiz- (links) und Kühlkurven (rechts) einer mit Phospholipid/Gallensalz (1_RT) und einer allein mit Phospholipid (5_RT) stabilisierten Dispersion (Heiz- und Kühlrate 5 °C/min, Messung nach Herstellung der Dispersionen).

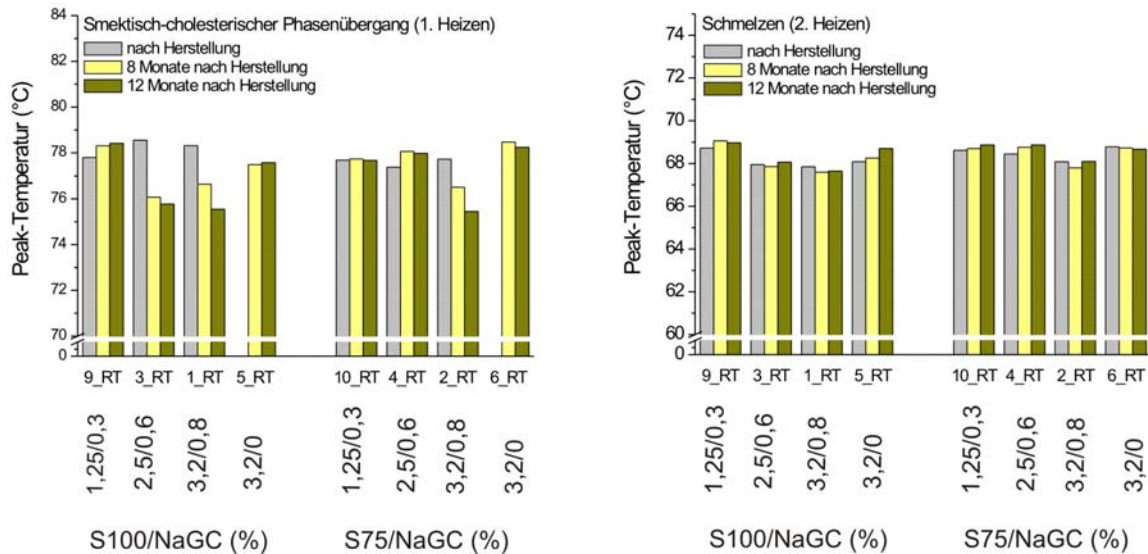


Abbildung 4.4.6: Verschiebung der Peak-Temperaturen des smektisch-cholesterischen Übergangs im 1. Heizvorgang sowie des Schmelzpeaks rekristallisierter Nanopartikel im 2. Heizvorgang (5 °C/min) in Abhängigkeit von Lagerungszeit.

Das Kristallisationsverhalten war sowohl von der thermischen Vorbehandlung als auch von dem Alter der Dispersionen abhängig. Bei der Kristallisation der thermisch unbehandelten Dispersionen (1. Kühlen) kristallisierte ein größerer Anteil schon bei höheren Temperaturen. Weiterhin war das Hauptkristallisationsereignis im Vergleich zu dem der vorher aufgeschmolzenen Dispersion (2. Kühlen) zu tieferen Temperaturen verschoben (Abb. 4.4.7). In einigen Dispersionen war das Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen zweigipflig.

Das Kristallisationsmuster der vorher aufgeschmolzenen Dispersion (2. Kühlen) veränderte sich während der Lagerung². Mit zunehmender Lagerungszeit kam es mit Ausnahme von 9_RT (1,25% S100, 0,3% NaGC) zu einer deutlichen Verschiebung der Peak-Temperatur des Hauptkristallisationspeaks (Abb. 4.4.8). Außerdem nahm mit Ausnahme von 6_RT (3,2% S75) die Fläche unter dem 1. Kristallisationspeak ab.

² Die Kristallisation der thermisch unbehandelten Dispersionen (1. Kühlen) wurde für diese Dispersionen nicht über den gesamten Lagerungszeitraum untersucht.

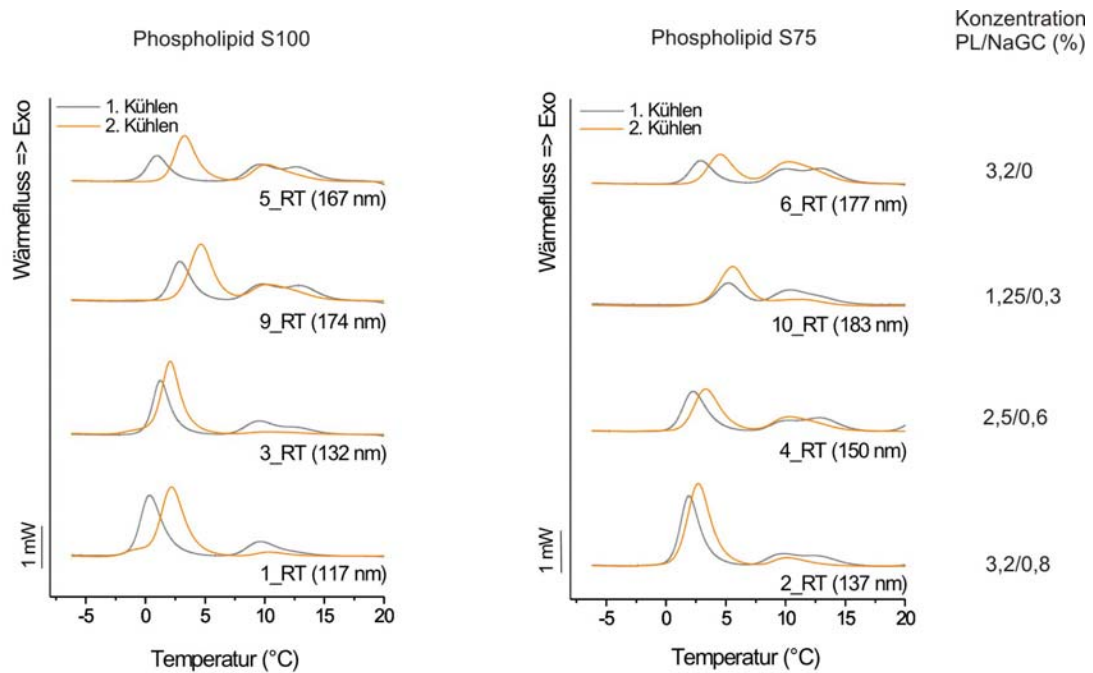


Abbildung 4.4.7: DSC Kühlkurven (0,5 °C/min) der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) und der vorher aufgeschmolzenen (2. Kühlen) Dispersionen (Messungen 3 Monate nach Herstellung).

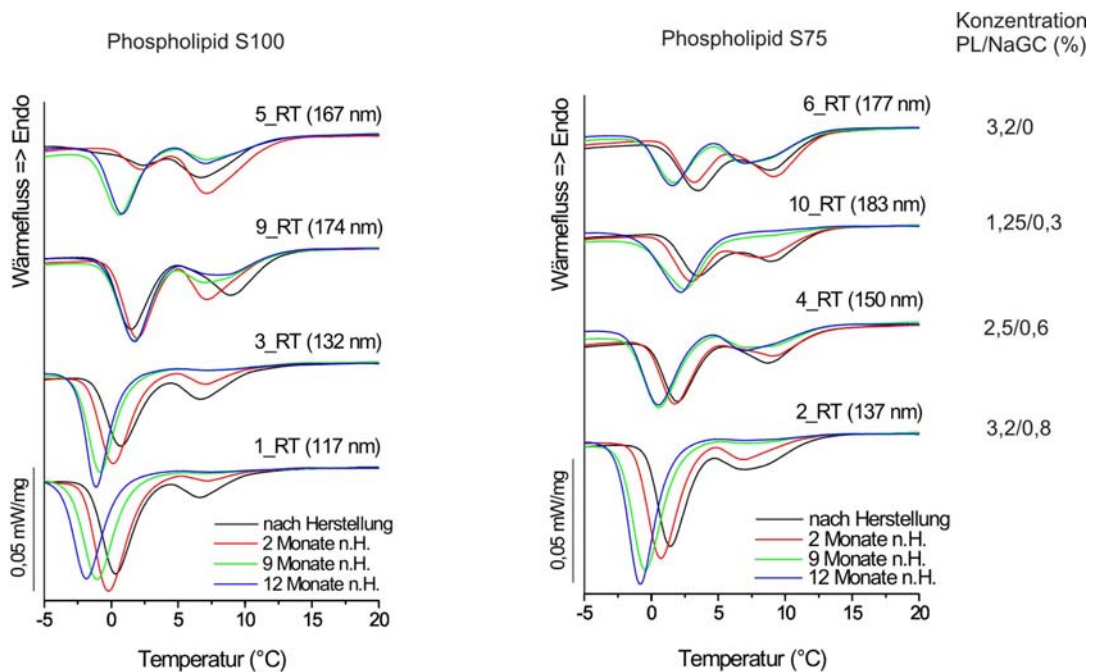


Abbildung 4.4.8: DSC Kühlkurven (5 °C/min) der jeweils vorher aufgeschmolzenen Dispersionen (2. Kühlen) zu unterschiedlichen Lagerungszeiten.

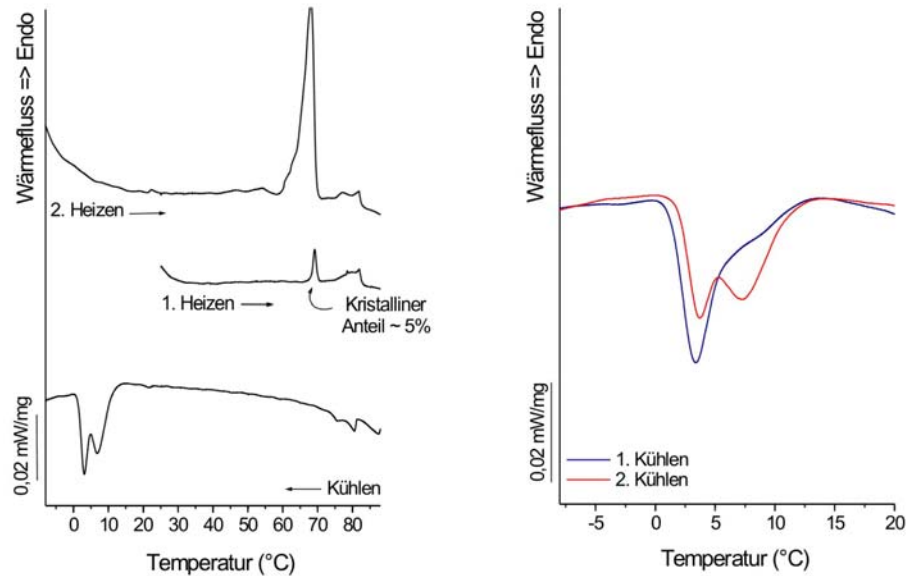


Abbildung 4.4.9: Links: DSC-Heiz- und Kühlkurven (5 °C/min) einer mit Ei-Lecithin stabilisierten Dispersion (S22_RT: 3,2% E80, 0,8% NaGC), Messung 5 Monate nach Herstellung der Dispersion. Rechts: Vergleich der Kristallisation der thermisch unbehandelten Originalprobe (1. Kühlen) und der vorher aufgeschmolzenen Dispersion (S22_RT), Messung nach Herstellung der Dispersion, Kühlrate 5 °C/min.

Die mit Ei-Lecithin und Gallensalz stabilisierte Dispersion zeigte ein ähnliches Phasenverhalten wie die mit Soja-Lecithin stabilisierten Dispersionen (Abb. 4.4.9) mit einem zweigipfligem Kristallisationsgeschehen und einem kleinen Peak vor dem eigentlichen Schmelzereignis. Im Gegensatz zu den mit Soja-Lecithin stabilisierten Dispersionen wurde bei der Kristallisation der thermisch unbehandelten Dispersion (1. Kühlen) nur eine Schulter bei höheren Temperaturen beobachtet. Die Übergangstemperatur des Hauptkristallisationspeaks lag sowohl bei der Kristallisation der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) als auch bei der der vorher aufgeschmolzenen Nanopartikel (2. Kühlen) deutlich über 0 °C. Über den Beobachtungszeitraum von 5 Monaten wurden keine deutlichen Veränderungen des Kristallisationsverhaltens beobachtet.

Ultrastruktur

In den Cryo-Präparationen wurden verschiedene kolloidale Strukturen beobachtet (Abb. 4.4.10). Die Cholesterylmyristat-Partikel wiesen einen relativ gleichmäßigen Kontrast auf, wodurch sie gut von Phospholipid-Vesikeln, die die typische Bilayerstruktur zeigten, unterschieden werden können. Enthielten die Dispersionen zusätzlich Gallensalz, waren auch sehr kleine stäbchenförmige Gebilde mit starkem Kontrast sichtbar. Es sollte sich hier um Gallensalz-Mizellen bzw. Gallensalz-Phospholipid-Mischmizellen handeln (Abb. 4.4.10 A). In den schmelzhomogenisierten Dispersionen (mittlere Partikelgrößen ≥ 100 nm) wurden zwei unterschiedliche Fraktionen von Cholesterylmyristat-Partikeln beobachtet: eine sehr

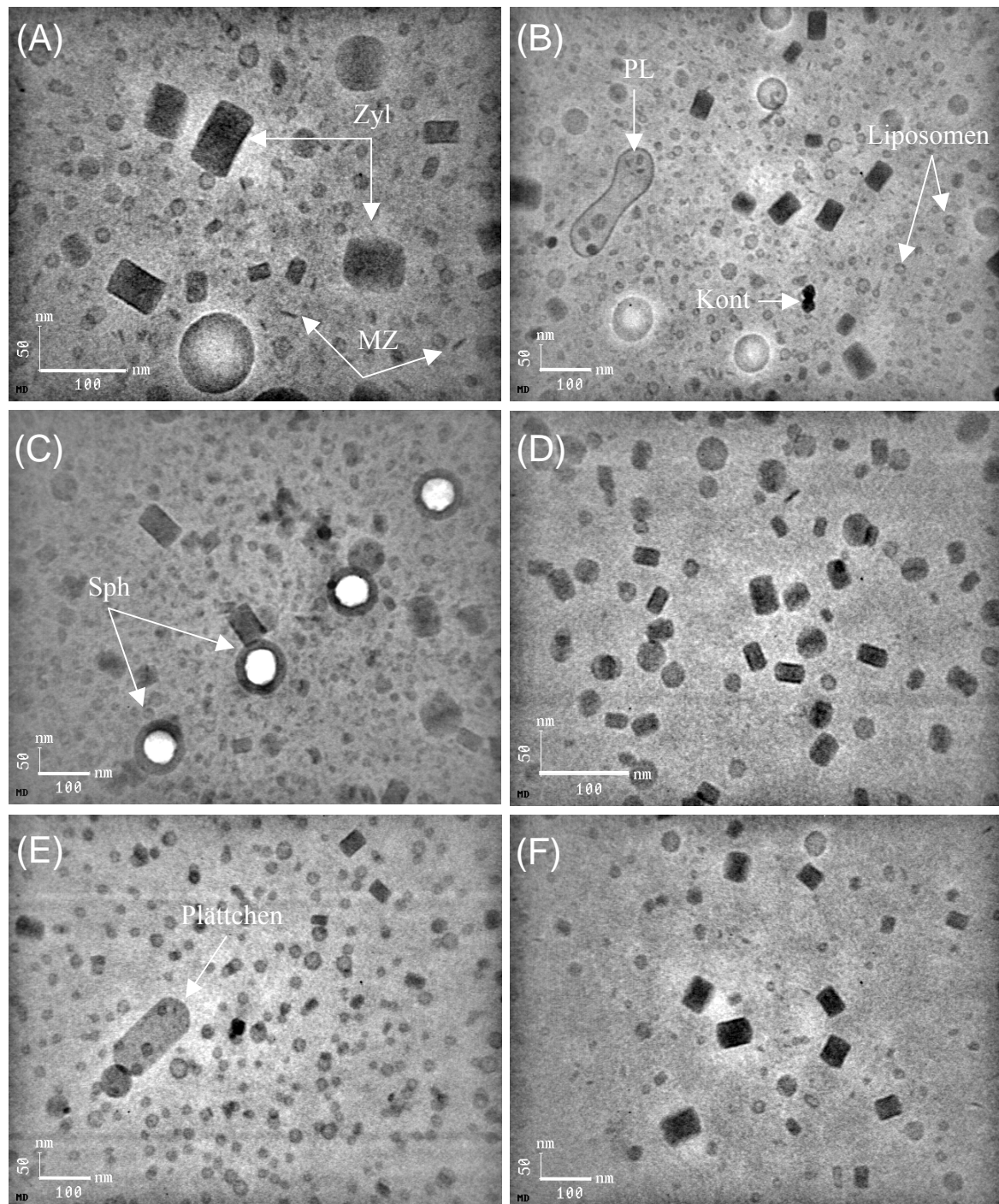


Abbildung 4.4.10: Cryo-TEM Aufnahmen von mit Phospholipiden stabilisierten Dispersionen:

- (A), (B) und (C) 1_RT (5% CM, 3,2% S100, 0,8% NaGC),
 (D) 13_RT (5% CM, 2% S100, 0,5% NaGC),
 (E) 5_RT (5% CM, 3,2% S100) und
 (F) 9_RT (5% CM, 1,25% S100, 0,3% NaGC).

Folgende Strukturen sind in der Abbildung markiert: Zyl – smektische Partikel mit zylinderförmiger Gestalt, Sph – sehr instabile Emulsionspartikel mit wahrscheinlich sphärischer Gestalt, MZ – Mizellen, PL – größere Phospholipid-Struktur, Liposomen, Plättchen, Kont – Kontamination der Probe mit Ethan.

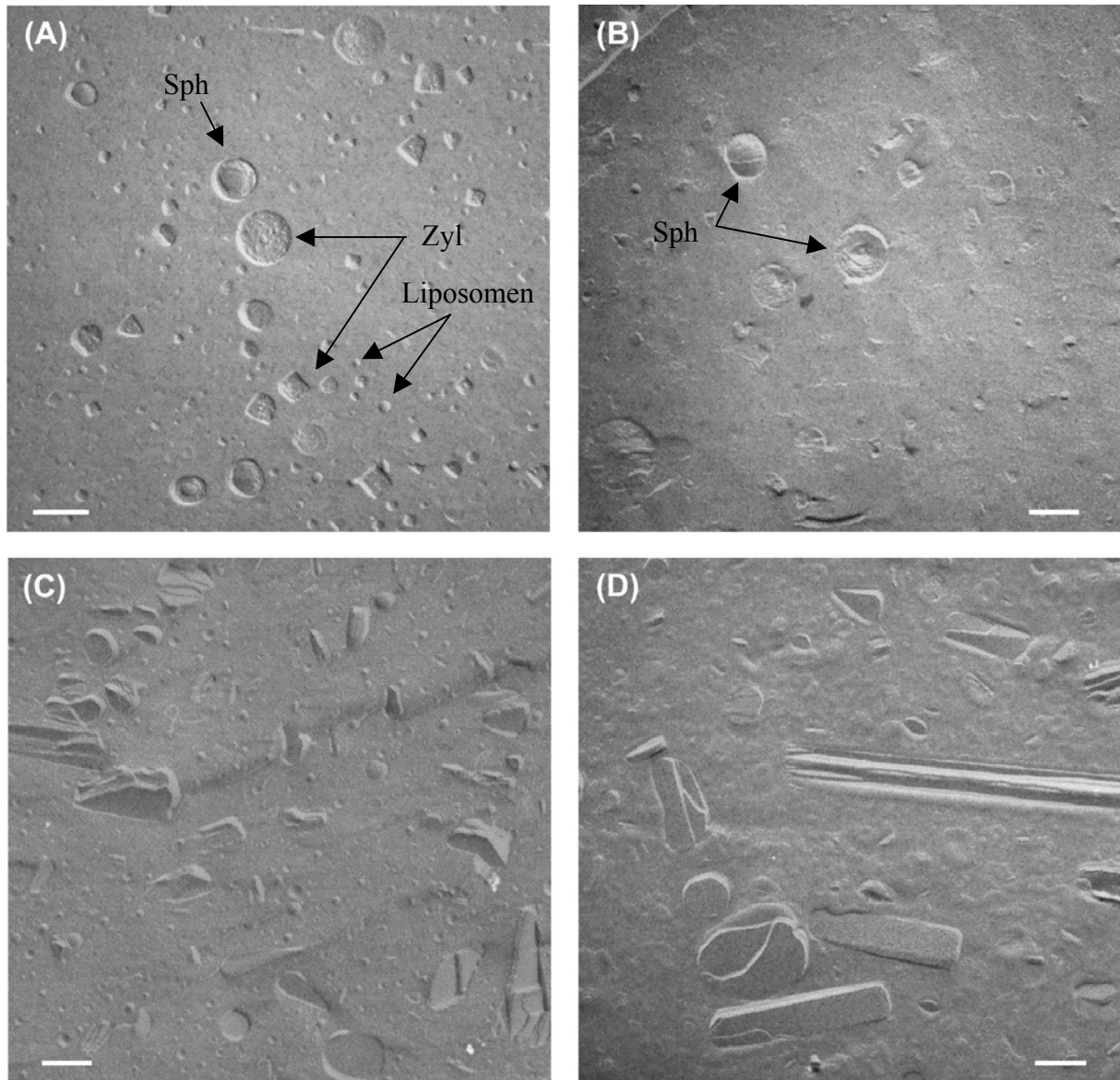


Abbildung 4.4.11: TEM-Aufnahmen von Gefrierbruch-Replika phospholipidstabilisierter Dispersionen (Balken 140 nm):

- (A) 1_RT (5% CM, 3,2% S100, 0,8% NaGC),
 (B) 9_RT (5% CM, 1,25% S100, 0,3% NaGC),
 (C) ChomyPLGC1_KS (5% CM, 2,5% S100, 0,6% NaGC) und
 (D) ChomyPLGC2_KS (5% CM, 2,5% S100, 0,6% NaGC).

Folgende Strukturen sind in der Abbildung markiert: Zyl – smektische Nanopartikel mit zylinderförmiger Gestalt, Sph – Partikel mit Zwiebelschalenstruktur, Liposomen.

instabile, im Elektronenstrahl sofort verkochende (Abb. 4.4.10 C) und eine relativ stabile Population. Die stabilen Partikel wiesen sowohl runde als auch viereckige Formen auf. In einer Dispersion mit sehr kleinen Partikeln (13_RT, Herstellung mit dem Emulsions-Fällungsverfahren) wurden keine instabilen Partikel beobachtet (Abb. 4.4.10 D). Die gegenüber dem Elektronenstrahl stabilen Partikel scheinen eine annähernd zylinderförmige

Gestalt aufzuweisen. Sie können aufgrund unterschiedlicher Ausrichtungen in der Präparation verschiedene Erscheinungsformen haben: rund in der Aufsicht, viereckig in der Seitenansicht und oval-rundlich in der Ansicht beispielsweise schräg von oben auf ein Partikel (s. Schema Abb. 4.4.38). Durch Veränderung des Betrachtungswinkels der Probe im Elektronenmikroskop können solche zylinderförmigen Partikel in unterschiedlichen Ansichten dargestellt werden, was für eine mit Tween 80 stabilisierte Dispersion gezeigt wurde (s.u. Abb. 4.4.30). Vereinzelt wurden auch größere Aggregate mit geringem Kontrast sowie größere Vesikel-Strukturen beobachtet (Abb. 4.4.10 B). In Abbildung 4.4.10 E ist ein plättchenförmiges Partikel markiert, bei dem es sich um ein kristallines Partikel handeln dürfte. Im Gefrierbruch wurden runde und eckige Partikel, die gleichmäßig strukturiert erschienen, beobachtet (Abb. 4.4.11 A-B). Bei diesen Strukturen könnte es sich um die zylinderförmige Partikelfraktion handeln. Neben solchen Partikeln waren auch einige runde Partikel mit einer Schicht- bzw. Zwiebelschalenstruktur sichtbar, was auf eine sphärische Gestalt hinweist (Abb. 4.4.11 A-B). Bei den zahlreichen kleinen runden Strukturen mit glatter Oberfläche handelt es sich um Liposomen, die aufgrund des Phospholipid-Überschusses in den Dispersionen gebildet werden [Rotenberg et al. 1991, Westesen und Wehler 1992, Férézou et al. 2001]. Kristalline Cholesterylmyristat-Partikel (Abb. 4.4.11 C-D, bei 4°C gelagerte Dispersionen) weisen eine anisometrische plättchenförmige Gestalt auf, wobei neben länglichen auch rundliche Plättchen beobachtet wurden. Liposomen, die in den bei 4 °C gelagerten Dispersionen keine Veränderung ihrer Struktur zeigten, sind vor allem in Abbildung 4.4.11 C gut zu erkennen.

Spezielle Untersuchungen zum Phasenverhalten

Für die Untersuchungen wurden Cholesterylmyristat-Dispersionen gleicher Zusammensetzung (5% CM, 3,2% S100 und 0,8% NaGC) verwendet. Zur Erzielung unterschiedlicher Partikelgrößen wurden die Dispersionen unter verschiedenen Bedingungen homogenisiert (Kapitel 4.3). Für die Herstellung dieser Dispersionen wurden die Stabilisatoren in der wässrigen Phase gelöst bzw. dispergiert.

Das Phasen- und vor allem das Kristallisationsverhalten smektischer, auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Nanopartikeln scheint insbesondere von drei Faktoren abhängig zu sein:

- von der Partikelgröße,
- von der thermischen Vorbehandlung und
- vom Alter der Dispersionen.

Einfluss der Partikelgröße. Mit steigender mittlerer Partikelgröße nahm in den untersuchten Dispersionen die Fläche unter dem Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen sowohl bei der Kristallisation der Originalprobe (1. Kühlen) als auch bei der Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Nanopartikel (2. Kühlen) nahezu linear zu (Abb. 4.4.12), so dass die Annahme nahe liegt, dass es sich bei der bei höheren Temperaturen kristallisierenden Fraktion um Partikel mit größerem Durchmesser handelt. Die Lage der Kristallisationsereignisse wurde im Gegensatz dazu durch die Partikelgröße nur wenig beeinflusst (Abb. 4.4.12).

Um den Einfluss der Partikelgröße auf das Kristallisationsverhalten näher zu untersuchen, wurden zwei Dispersionen (H_RT und M1_RT) mit unterschiedlicher mittlerer Partikelgröße einer Ultrazentrifugation unterworfen. Durch die Ultrazentrifugation können in Abhängigkeit von der Zentrifugationszeit Fraktionen größerer Partikel abgetrennt werden, wobei die smektischen Partikel flotieren und kristalline Partikel aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Zentrifugenröhrchens abgeschieden werden. Für die DSC-Untersuchungen wurden jeweils die mittleren Fraktionen in den Zentrifugenröhrchen verwendet, die neben Phospholipid-Vesikeln kleinere Cholesterylmyristat-Nanopartikel enthielten.

Die smektischen Nanopartikel waren auch nach längerer Zentrifugation physikalisch stabil. Nach 4stündiger Zentrifugation mit 20 000 U/min (23 °C) einer Dispersion mit einer mittleren Partikelgröße von 205 nm (PI = 0,15) vor der Zentrifugation (H_RT) kam es zu einer fast vollständigen Abtrennung der smektischen Nanopartikel. Nach Redispergierung der oberen,

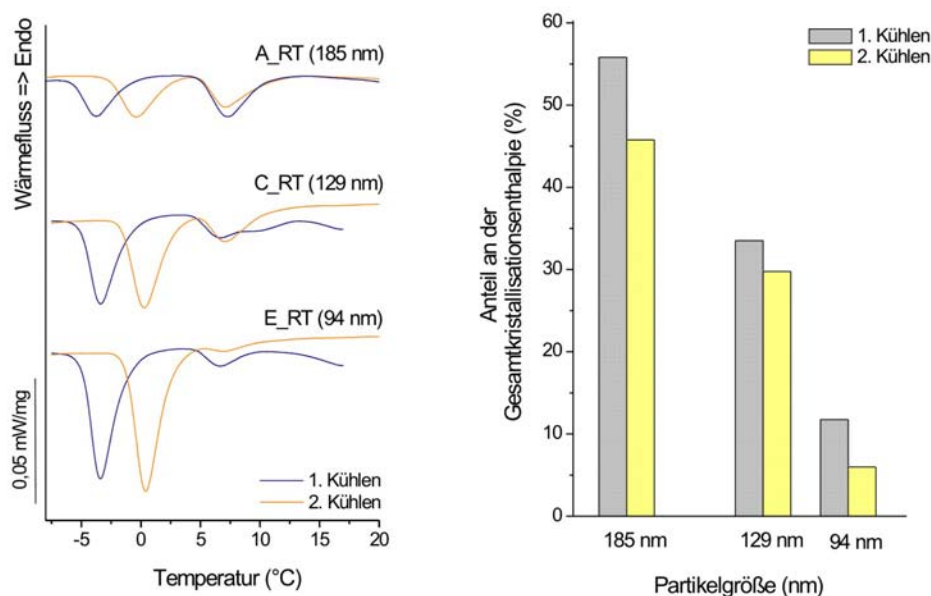


Abbildung 4.4.12: Links: DSC-Kühlkurven der thermisch unbehandelten (blau) und der vorher aufgeschmolzenen Proben (rot) mit unterschiedlichen mittleren Partikelgrößen (PCS). Rechts: Prozentualer Anteil der bei höheren Temperaturen kristallisierenden Fraktion an der Gesamtkristallisationsenthalpie der thermisch unbehandelten (grau) und vorher aufgeschmolzenen (gelb) Dispersionen. Messungen 2 Monate nach Herstellung der Dispersionen.

weißen halbfesten Schicht wurde ein PCS z-average von 209 nm ($PI = 0,12$) gemessen. Der PCS z-average der mittleren, durchscheinenden und leicht gelblich gefärbten Fraktion betrug 46 nm ($PI = 0,19$). Auf dem Boden der Zentrifugenröhrchen waren einige Kristalle sichtbar, die nicht näher untersucht wurden. Die mittlere Fraktion wurde in der DSC (Scanrate $0,5\text{ °C/min}$) untersucht und zeigte beim Abkühlen nach Aufschmelzen der Dispersion (2. Köhlen) ein Kristallisationsereignis bei $0,8\text{ °C}$ (Onset = $3,6\text{ °C}$) und beim nachfolgenden Aufheizen ein breites Schmelzereignis mit zwei Peaks bei $58,6\text{ °C}$ und $64,0\text{ °C}$. Alle Phasenübergänge waren aufgrund der geringen Anzahl an Cholesterylmyristat-Partikeln in dieser Fraktion sehr klein (ca. 1% im Vergleich zur Originaldispersion), so dass die flüssigkristallinen Phasenübergänge nicht ausgewertet werden konnten. Für die fraktionierte Abtrennung von Partikelfractionen mit größeren Durchmessern wurde die Dispersion (H_RT) unterschiedlich lange mit $10\,000\text{ U/min}$ zentrifugiert. Mit zunehmender Zentrifugationszeit nahm die mittlere Partikelgröße (PCS) der mittleren Fraktion ab (Abb. 4.4.13, links). In der Volumenverteilung (LD-PIDS) nahm mit zunehmender Zentrifugationszeit die Fläche unter dem Maximum bei ca. 300 nm ab, bis nach 5stündiger Zentrifugation eine monomodale Partikelgrößenverteilung erhalten wurde (Abb. 4.4.13, rechts).

Um höher konzentrierte Fraktionen in diesem Partikelgrößenbereich zu erhalten, wurde eine Dispersion mit einem geringeren mittleren Partikeldurchmesser (M1_RT: PCS z-average 134 nm, $PI = 0,13$) mit $20\,000\text{ U/min}$ bei 23 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation über 1,

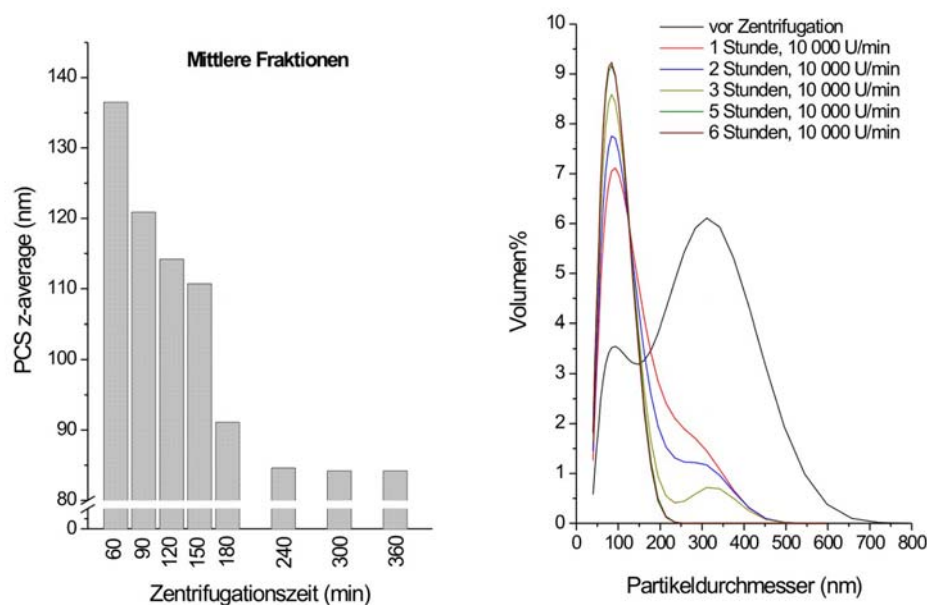


Abbildung 4.4.13: Partikelgröße der durch Zentrifugation gewonnenen mittleren Fraktionen in Abhängigkeit von der Zentrifugationszeit. Links: PCS z-average (PI zwischen $0,13$ und $0,17$). Rechts: Volumenverteilung LD-PIDS.

2 bzw. 3 Stunden wurden mittlere Partikeldurchmesser (PCS) von 84 nm ($PI = 0,15$), 69 nm ($PI = 0,22$) bzw. 63 nm ($PI = 0,20$) für die mittleren Fraktionen gemessen. Die Fraktionen wurden in der Micro-DSC (Scanrate $0,5\text{ °C/min}$) untersucht. Die Kristallisation der thermisch unbehandelten Dispersionen (1. Kühlen) war nur bei den beiden Fraktionen mit einer mittleren Partikelgröße $< 70\text{ nm}$ eingipflig (Abb. 4.4.14 links). Die Fraktion mit einem PCS z-average von 84 nm zeigte auch ein kleines Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen. Beim Abkühlen der vorher aufgeschmolzenen Dispersionen (2. Kühlen) wurde in keiner Fraktion ein Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen beobachtet. In den Fraktionen mit einer mittleren Partikelgröße $< 70\text{ nm}$ kam es jedoch bei tieferen Temperaturen zur Ausbildung einer Schulter. Auffällig war weiterhin, dass der Kristallisationspeak in diesen beiden Fraktionen bei der Kristallisation der aufgeschmolzenen Dispersion nicht zu höheren Temperaturen verschoben war, sondern in etwa die gleiche Lage aufwies wie das Kristallisationsereignis der Originaldispersion (1. Kühlen). In allen drei Fraktionen war das Schmelzereignis der kristallisierten Partikel sehr breit und wies mehrere Spitzen auf (Abb. 4.4.14, rechts).

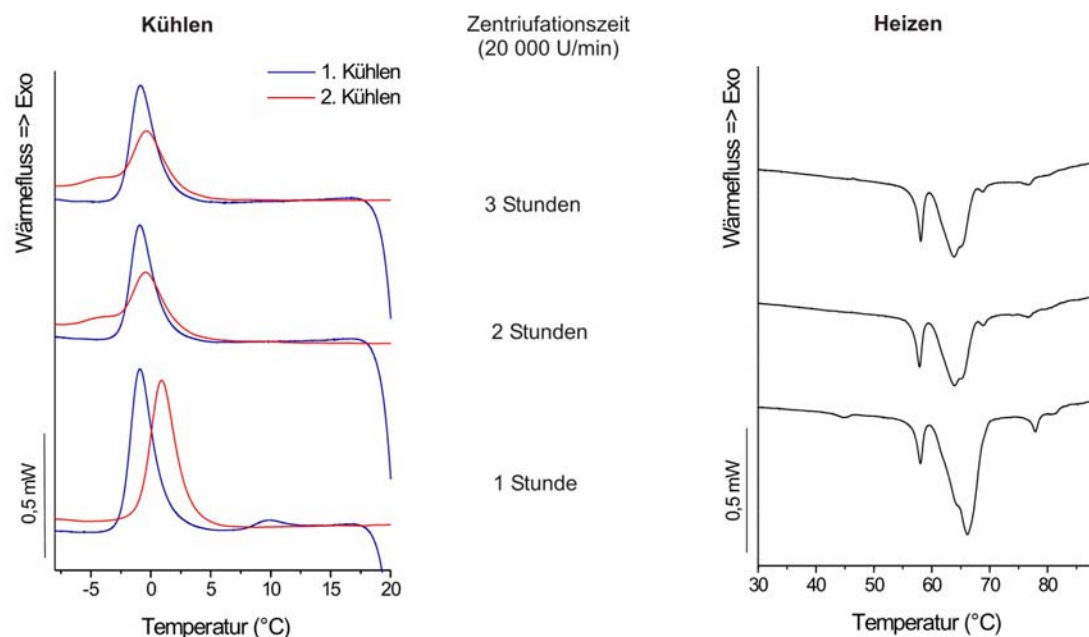


Abbildung 4.4.14: DSC-Kühl- und Heizkurven ($0,5\text{ °C/min}$) der mittleren Fraktionen nach unterschiedlich langer Zentrifugation.

Einfluss der thermischen Behandlung. Bei der Kristallisation der Originalprobe (1. Kühlen) war der Anteil der bei höheren Temperaturen kristallisierenden Partikel größer und das Hauptkristallisationsereignis zu deutlich tieferen Temperaturen verschoben im Vergleich zur Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Proben (2. Kühlen). Die Onset-Temperaturen des

Hauptkristallisationsereignisses der thermisch unbehandelten Dispersionen lagen bei ca. $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei der Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Probe zwischen $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im Gegensatz hierzu war die Lage des Kristallisationsereignisses bei höheren Temperaturen nahezu unabhängig von der thermischen Vorbehandlung. Sowohl für die Originaldispersionen als auch für die vorher aufgeschmolzenen Proben wurden Onset-Werte zwischen 9 und $11\text{ }^{\circ}\text{C}$ in allen drei Dispersionen im 1. und 2. Kühlprozess gemessen.

Zur Untersuchung des Einflusses der thermischen Belastung wurden die Dispersionen A_RT (z-average 185 nm , $\text{PI} = 0,14$) und E_RT (z-average 94 nm , $\text{PI} = 0,14$) mit einer Scanrate von $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ zunächst auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und anschließend mehrmals hintereinander kontrolliert aufgeschmolzen und kristallisiert (Abb. 4.4.15). Das Phasenverhalten der kolloidalen Cholesterylmyristat-Partikel war vollständig reversibel. Es wurde keine deutliche Abnahme der Enthalpien der Phasenumwandlungen (Gesamtenthalpien des Kristallisations- bzw. Schmelzprozesses) beobachtet. Durch die thermische Beanspruchung kam es auch nicht zu einem deutlichen Partikelgrößenwachstum in den Dispersionen. In den Messungen nach der DSC-Untersuchung wurden nur geringfügig höhere PCS z-average-Werte von 188 nm (A_RT, $\text{PI} = 0,11$) bzw. 96 nm (E_RT, $\text{PI} = 0,16$) ermittelt. In den Kühlvorgängen wurden die typischen Unterschiede im Kristallisationsverhalten der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) und der aufgeschmolzenen (2. Kühlen) Probe beobachtet: geringere Fläche unter dem Ereignis bei höheren Temperaturen und höhere Kristallisationstemperatur der bei tieferen Temperaturen kristallisierenden Fraktion im 2. Kühlvorgang. Mit den weiteren Kühlzyklen kam es zur Ausbildung eines weiteren Kristallisationspeaks, dessen Lage ungefähr der Lage des Hauptkristallisationsereignisses der Originaldispersion entsprach und dessen Fläche mit zunehmender Zykluszahl zunahm. Dieser Übergang war besonders in der Dispersion mit kleinerer mittlerer Partikelgröße (E_RT) ausgeprägt und wurde schon im 2. Kühlvorgang beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte dieser Übergang in der Dispersion mit größerer mittlerer Partikelgröße (A_RT) erst nach dem 4. Kühlvorgang deutlich als Schulter detektiert werden. Mit Ausnahme der Kristallisation der thermisch unbehandelten Originalprobe (1. Kühlen) veränderte sich die Lage des Hauptkristallisationsereignisses nur geringfügig mit zunehmender Zykluszahl (Abb. 4.4.15). In der Dispersion mit größerem mittleren Partikeldurchmesser (A_RT) kam es weiterhin mit zunehmender Zykluszahl zu einer stetigen Abnahme der Fläche des Kristallisationsereignisses bei höheren Temperaturen. Im letzten Kühlvorgang wurde eine Schulter bei höheren Temperaturen ausgebildet. Im Gegensatz dazu veränderte sich in der Dispersion mit kleinerer mittlerer Partikelgröße (E_RT) die Fläche

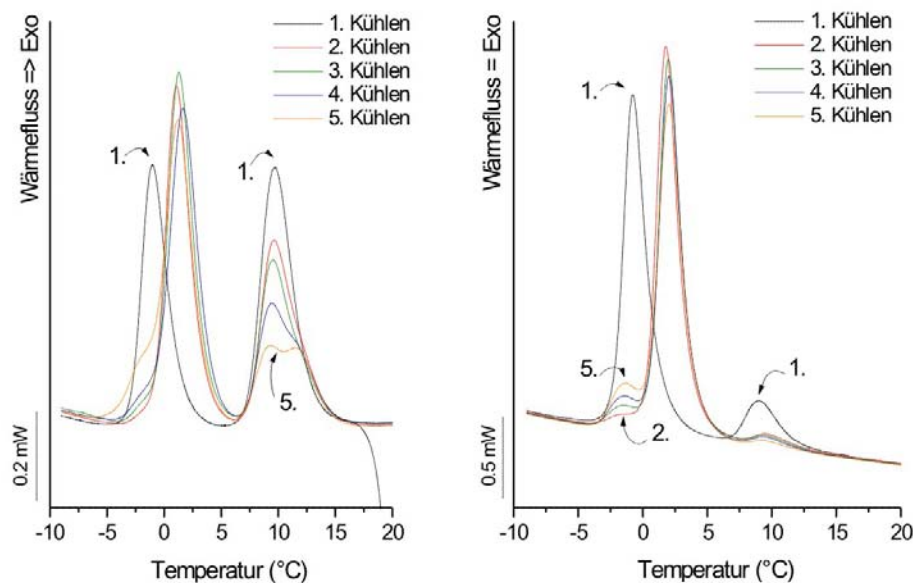


Abbildung 4.4.15: DSC-Kühlkurven der Dispersionen A_RT (links) und E_RT (rechts) beim mehrmaligen Abkühlen und Aufheizen der Dispersionen mit einer Scanrate von 0,5 °C/min). Die Dispersionen wurde zunächst auf -8 °C abgekühlt und anschließend jeweils 5mal auf 90 °C erwärmt und auf -8 °C abgekühlt.

unter dem Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen nach dem 2. Kühlvorgang nur noch geringfügig. Die Peakfläche war allerdings schon im 2. Kühlvorgang sehr gering: ca. 2% der Gesamtkristallisationsenthalpie.

In den Heizvorgängen wurde eine Verbreiterung und Verschiebung des kleineren Schmelzereignisses zu tieferen Temperaturen sowie eine Zunahme der Fläche mit zunehmender Zykluszahl beobachtet, während sich die Lage des Hauptschmelzereignisses nicht deutlich veränderte. Mit zunehmender Zahl der Kühl- bzw. Heizzyklen verschoben sich die flüssigkristallinen Phasenübergänge zu tieferen Temperaturen, was insbesondere beim smektisch-cholesterischen Übergang deutlich wurde.

In einer weiteren DSC-Messung wurde untersucht, inwieweit die beobachteten Veränderungen im Kristallisationsverhalten nach Aufschmelzen der Dispersionen durch Lagerung reversibel sind, so ob nach längerer Lagerung der Dispersion bei 20 °C das ursprünglich beobachtete Kristallisationsmuster der thermisch unbehandelten Originalprobe wieder eintritt. Eine Dispersion (D_RT, PCS z-average 96 nm, PI = 0,15) wurde hierzu mit 0,5 °C/min in der DSC auf -8 °C abgekühlt, auf 90 °C aufgeheizt, auf 20 °C abgekühlt und dann jeweils unterschiedlich lang bei dieser Temperatur gehalten, bevor sie wiederum auf -8 °C abgekühlt wurde. Mit zunehmender Zeitdauer nach Aufschmelzen der Partikel verschob sich das Hauptkristallisationsereignis zu tieferen Temperaturen, wobei nach einer Standzeit von 240 Stunden bei 20 °C die Lage des Peaks mit der der Originalprobe nahezu übereinstimmte (Abb. 4.4.16). Im Gegensatz dazu war die Abnahme der Fläche des

Kristallisationspeaks bei höheren Temperaturen nicht reversibel. Der Anteil dieses Peaks an der Gesamtkristallisationsenthalpie lag bei der Kristallisation der unbehandelten Originalprobe bei ca. 13% und war auch nach längeren Standzeiten nach dem Aufschmelzen der Dispersionen deutlich geringer (2-3%). Eine ähnliche Verschiebung des Hauptkristallisationspeaks zu niedrigeren Temperaturen wurde für eine Dispersion in DSC-Messungen kurze Zeit nach Herstellung der Dispersion beobachtet (M1_RT, Abb. 4.4.16). Einige Stunden nach Herstellung wurde eine Kristallisationstemperatur von $-0,8\text{ °C}$ für die thermisch unbehandelte Originalprobe (1. Kühlen) gemessen. 3 Tage später war die Kristallisationstemperatur zu -3 °C verschoben und lag im Weiteren zwischen $-2,7$ und $-3,2\text{ °C}$ (jeweils 1. Kühlen, thermisch unbehandelte Proben, Peak-Temperaturen, Kühlrate 5 °C/min).

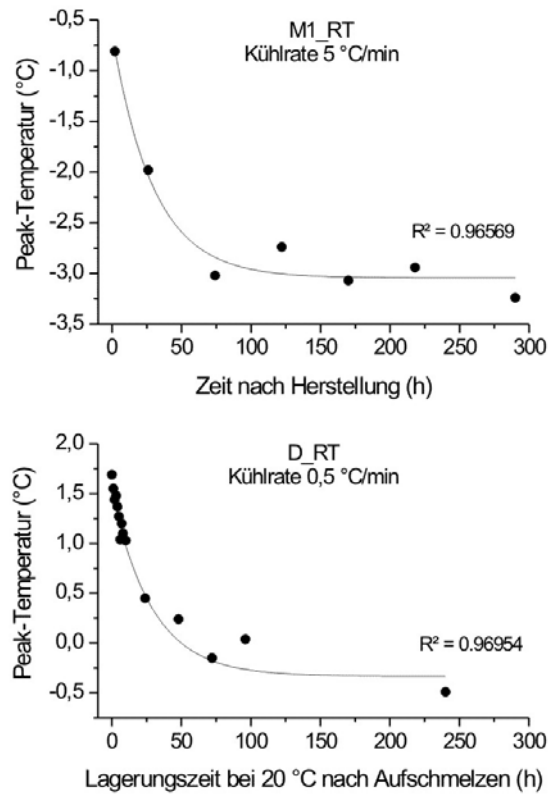


Abbildung 4.4.16: DSC-Kristallisationstemperaturen (Peak-Temperaturen, logarithmischer Fit) des Hauptkristallisationspeaks in Abhängigkeit von der Lagerungszeit nach Herstellung der Dispersion (oben, M1_RT) und den "Standzeiten" der aufgeschmolzenen Dispersionen nach Kühlen auf 20 °C in der DSC (unten, D_RT). Die unterschiedlichen Kristallisationstemperaturen der Dispersionen M1_RT und D_RT sind auf die unterschiedlichen Kühlraten zurückzuführen.

Einfluss der Lagerungszeit. Die Dispersionen A_RT, C_RT und E_RT wurden über einen Zeitraum von 7 Monaten beobachtet (2 bis 9 Monate nach Herstellung). Über den Lagerzeitraum änderten sich die Onset-Temperaturen des Hauptkristallisationspeaks nur geringfügig ($< 1\text{ °C}$) sowohl beim Kühlen der Originaldispersionen als auch bei der Kristallisation der zuvor aufgeschmolzenen Proben (Abb. 4.4.17). Im Kristallisationsvorgang der vorher aufgeschmolzenen Proben kam es in allen drei untersuchten Dispersionen zu einer Abnahme der Fläche unter dem Peak bei höheren Temperaturen (Abb. 4.4.17). In allen drei Dispersionen wurde auch eine Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergangstemperaturen beobachtet, die in der Dispersion mit der größten mittleren Partikelgröße

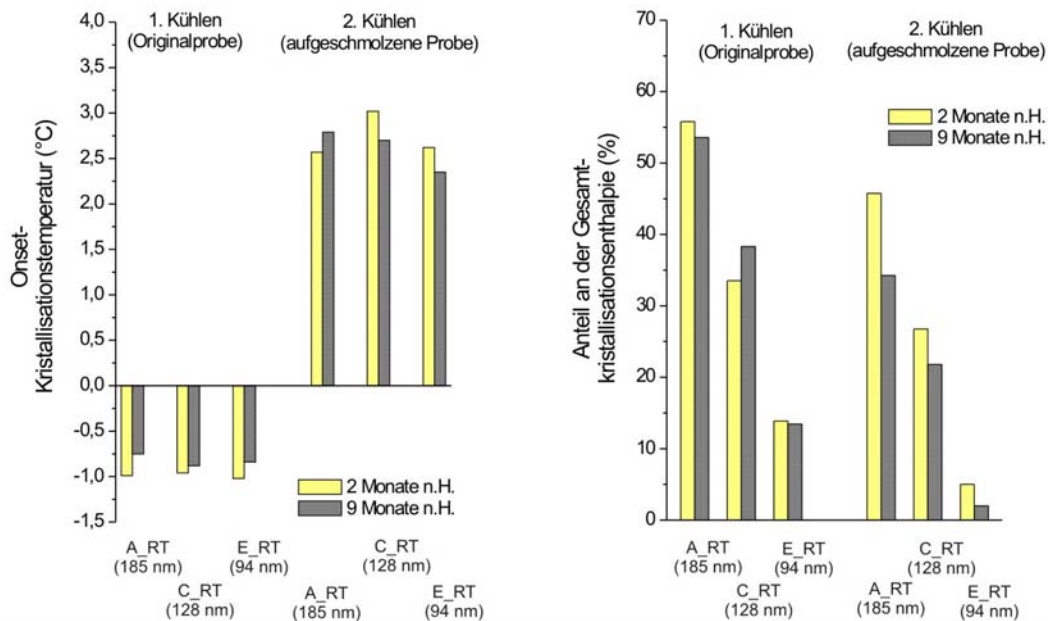


Abbildung 4.4.17: Veränderungen im Kristallisationsverhalten von Dispersionen mit unterschiedlichem mittleren Partikelgrößen über den Zeitraum von 7 Monaten. Links: Onset-Temperaturen des Hauptkristallisationspeaks im 1. und 2. Kühlvorgang. Rechts: Anteil der Enthalpie des Kristallisationspeaks bei höheren Temperaturen an der Gesamtenthalpie im 1. und 2. Kühlvorgang. Heiz- und Kühlrate 5 °C/min.

(A_RT) am stärksten ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu war die Lage des Schmelzereignisses über den Beobachtungszeitraum unverändert bzw. zu geringfügig höheren Temperaturen verschoben (Abb. 4.4.18).

Um die Veränderungen des Kristallisationsverhaltens nach Herstellung der Dispersionen näher zu untersuchen, wurde eine Dispersion (M1_RT) mit einem PCS z-average von 134 nm (PI = 0,12) während eines Zeitraums von 4 Monaten in kurzen Abständen nach Herstellung der Dispersion in der DSC untersucht. Veränderungen im Kristallisationsmuster der Originalprobe (1. Köhlen) wurden insbesondere in den ersten Tagen nach Herstellung der Dispersion beobachtet (Abb. 4.4.16). Die Fläche unter dem Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen änderte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht deutlich und machte einen Anteil an der

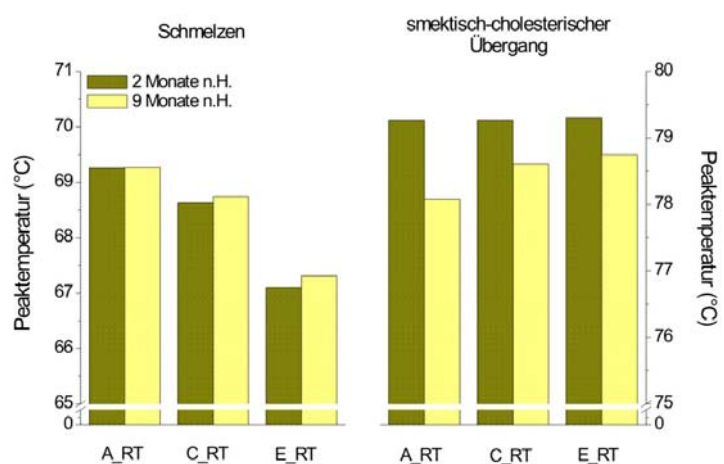


Abbildung 4.4.18: Veränderungen im Schmelzverhalten (Schmelzen der vorher kristallisierten Partikel) von Dispersionen mit unterschiedlichen mittleren Partikelgrößen über den Lagerungszeitraum von 7 Monaten. Heizrate 5 °C/min.

Gesamtkristallisationsenthalpie von ca. 41 und 42% aus. Die Veränderungen im Schmelzverhalten und bei der nachfolgenden Kristallisation (2. Kühlen) waren vergleichbar mit denen der Dispersionen C_RT und E_RT. Die Lage des Schmelzereignisses veränderte sich nicht deutlich über den Beobachtungszeitraum (Peaktemperatur 68,5 °C nach Herstellung und 68,6 °C nach 4monatiger Lagerung) während die flüssigkristallinen Phasenübergangstemperaturen mit zunehmender Lagerungszeit geringfügig zu tieferen Temperaturen verschoben waren (Peaktemperatur des smektisch-cholesterischen Übergangs 79,0 °C nach Herstellung und 78,5 °C nach 4monatiger Lagerung). Bei der Kristallisation der aufgeschmolzenen Dispersion (2. Kühlen) verschob sich das Hauptkristallisationsereignis um ca. 1,5 °C zu tieferen Temperaturen und der bei höheren Temperaturen kristallisierende Anteil nahm um ca. 12% während der Lagerung über 4 Monaten nach Herstellung der Dispersion ab.

Zusammenfassung und Diskussion – Besonderheiten im Kristallisationsverhalten

Wie DSC-Untersuchungen kolloidaler smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel zeigten, wiesen alle phospholipidstabilisierten Dispersionen ein sehr komplexes Kristallisationsverhalten auf. Ein ähnliches Kristallisationsverhalten wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Normalerweise werden solch "strukturierte" Kristallisationsmuster auf polymorphes Verhalten zurückgeführt [zur Mühlen et al. 1998, Jennings et al. 2000]. Für Cholesterylmyristat sind in der Literatur keine polymorphen Kristallformen beschrieben, und auch die temperaturabhängigen Röntgenmessungen der vorliegenden Arbeit ergaben keine Hinweise auf eventuelle polymorphe Umwandlungen im Kristallisationsvorgang. Die Ursachen für das sehr komplexe Kristallisationsverhalten smektischer Cholesterylmyristat-nanopartikel, die auf der Basis von Phospholipiden stabilisiert wurden, scheinen somit auf den dispersen Zustand zurückzuführen zu sein. Hauptursache sind wahrscheinlich die unterschiedlichen kolloidalen Partikelfractionen (sphärische und zylinderförmige Partikel), die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen wurden (Abb. 4.4.10 und 4.4.11). Eine zylinderförmige Partikelgestalt sollte aufgrund der Schichtstruktur der smektischen Phase energetisch günstiger sein als eine sphärische Gestalt, insbesondere für sehr kleine Partikel. Weiterhin wäre es denkbar, dass sphärische und zylinderförmige Partikel ein unterschiedliches Kristallisationsverhalten aufweisen. Die Herstellung der smektischen Nanopartikel erfolgte in der Regel bei Temperaturen oberhalb der isotropen Schmelze des Cholesterolesters, so dass beim Abkühlen eine Umlagerung der Cholesterolestermoleküle in die cholesterische und smektische Phase erfolgt. Aufgrund des hohen Oberflächendrucks von Emulsionstropfen im kolloidalen Zustand sind die Systeme bemüht, die kleinstmögliche Oberfläche einzunehmen. Mit abnehmender Partikelgröße sollte eine sphärische Gestalt für

die smektischen Partikel jedoch zunehmend energetisch ungünstig werden, da sich insbesondere im Partikelkern die smektische Phase nicht ausbilden kann. So ist eine kritische untere Partikelgröße anzunehmen, bei der sich beim Abkühlen der aufgeschmolzenen Lipidtröpfchen beim Übergang in die smektische Phase spontan zylinderförmige Partikel bilden. Weiterhin wäre es denkbar, dass sich sphärische, energetisch ungünstigere smektische Nanopartikel mit dem Lagerungszeitraum zu zylinderförmigen Partikeln umbilden.

Abhängigkeit der Lage des Hauptkristallisationsereignisses von der thermischen Vorbehandlung. Die Lage des Hauptkristallisationsereignisses war bei der Kristallisation der frisch aufgeschmolzenen Dispersionen, mit Ausnahme der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen mit sehr kleinen PCS z-averages (< 70 nm), im Vergleich zur thermisch unbehandelten Originalprobe zu deutlich höheren Temperaturen verschoben (Abb. 4.4.7 und 4.4.12). Diese Verschiebung war reversibel. Bei der Kristallisation nach 240stündiger Lagerung bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach dem Aufschmelzen entsprach die Kristallisationstemperatur ungefähr der der thermisch unbehandelten Dispersion ($1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs. $1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ Onset-Temperaturen der vorher aufgeschmolzenen bzw. thermisch unbehandelten Probe, Abb. 4.4.16). Dieses Verhalten könnte auf einer Umlagerung sphärischer Cholesterylmyristat-Partikel in energetisch günstigere zylinderförmige Partikel beruhen. Diese Annahme setzt jedoch voraus, dass auch kleinere Partikel bei der Bildung der smektischen Phase nicht spontan zylinderförmige Partikel bilden, sondern dass sich die sphärischen Partikel erst mit der Zeit in die energetisch günstigere Zylinderform umlagern. Für diese Annahme spricht weiterhin, dass sich der Kristallisationspeak der thermisch unbehandelten Dispersion in den ersten vier Tagen nach Herstellung einer Dispersion zu tieferen Temperaturen verschob. Nach diesem Zeitraum veränderte sich die Lage des Hauptkristallisationsereignisses beim Kühlen der thermisch unbehandelten Dispersion nur noch geringfügig. Gegen diese Annahme spricht, dass die durch Ultrazentrifugation gewonnenen Partikel mit mittleren Durchmessern (PCS) < 70 nm sowohl im 1. als auch im 2. Kühlvorgang eine Kristallisationstemperatur aufwiesen, die der der thermisch unbehandelten Dispersionen entsprach. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das Vorliegen sphärischer smektischer Nanopartikel nach Aufschmelzen nachzuweisen, beispielsweise durch zeitabhängige cryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen nach Aufschmelzen der Dispersionen.

Verschiebung des Hauptkristallisationsereignisses zu tieferen Temperaturen mit zunehmenden Alter der Dispersionen. Die Verschiebung der Kristallisationstemperatur während des Lagerungszeitraums (Abb. 4.4.6 und 4.4.16) ist wahrscheinlich durch eine Veränderung der Zusammensetzung der Partikelmatrix bzw. durch eine Veränderung der Grenzschicht der Partikel bedingt. Die Unterschiede der Kristallisationstemperaturen nach Herstellung und Langzeitlagerung waren besonders deutlich in Dispersionen, bei denen das Phospholipid für die Herstellung in der Lipidschmelze gelöst wurde. Sie nahmen mit steigender Stabilisatorkonzentration zu. Diese Beobachtung könnte auf eine anfänglich höhere Phospholipid-Konzentration in der Lipidmatrix im Vergleich zu Dispersionen, bei deren Herstellung das Phospholipid in der wässrigen Phase dispergiert wurde, gefolgt von einem Austritt der Phospholipide aus der Lipidmatrix mit zunehmender Lagerungszeit, zurückzuführen sein. Die Löslichkeit von Phospholipiden in Cholesterolestern ist in Anwesenheit von Wasser sehr gering [Small und Shipley 1974]. Ein sehr rascher Austritt des Phospholipids aus einer kristallisierten Cholesterylmyristat-Phospholipid-Mischung nach Kontakt mit Wasser wurde polarisationsmikroskopisch beobachtet (Kapitel 4.1). Eine weitere Möglichkeit ist die Einwanderung anderer lipophiler Stoffe in die Partikelmatrix bzw. -grenzfläche. Bei den verwendeten Phospholipiden handelte es sich nicht um Reinsubstanzen. Sie enthielten weitere Begleitstoffe wie z.B. Triglyceride (max. 2 bzw. 3% in S100 bzw. S75 und E80, m/m), Cholesterol (max. 1% E80, m/m) sowie Fettsäuren, die auch durch Hydrolyse der Phospholipide bei der Herstellung sowie Lagerung gebildet werden könnten. Die Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergänge und zum Teil auch des Schmelzereignisses zu tieferen Temperaturen mit zunehmendem Alter der Dispersionen steht in Übereinstimmung mit den oben stehenden Überlegungen.

Kristallisationspeak bei höheren Temperaturen. Die Größe dieses Kristallisationsereignisses korreliert sowohl für die Kristallisation der thermisch unbehandelten Originalprobe (1. Kühlen) als auch der vorher aufgeschmolzenen Dispersion (2. Kühlen) eindeutig mit der Partikelgröße (Abb. 4.4.12). So nahm mit zunehmender mittlerer Partikelgröße auch der Anteil der Enthalpie des Kristallisationsgeschehens bei höheren Temperaturen an der Gesamtenthalpie zu. Der Anteil der bei höheren Temperaturen kristallisierenden Fraktion war bei der Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Proben geringer als bei der Kristallisation der Originalprobe. Im Unterschied dazu wurde die Lage des Peaks durch die thermische Behandlung nicht beeinflusst. Weiterhin nahm bei der Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Dispersionen der bei höheren Temperaturen kristallisierende Anteil mit dem Alter der Dispersionen ab, während bei der Kristallisation der

thermisch unbehandelten Proben sich die Größe dieses Kristallisationspeaks kaum änderte. Die Abnahme des Enthalpieanteils dieses Peaks nach thermischer Behandlung scheint nicht reversibel zu sein. Selbst nach einer Lagerungszeit von 240 Stunden nach dem Aufschmelzen kam es nicht wieder zu einer Zunahme. Die Ursachen für dieses Verhalten sowie auch die teilweise beobachtete Schulterbildung sind bislang unklar.

Schulterbildung bei tieferen Temperaturen. Mit zunehmender thermischer Beanspruchung (mehrmaliges Aufschmelzen und Kristallisieren) kam es zur Ausbildung eines weiteren Kristallisationspeaks, dessen Lage vergleichbar war mit der des Hauptkristallisationspeaks der thermisch unbehandelten Probe (Abb. 4.4.15). Ein ähnlicher Peak wurde bei tieferen Temperaturen in den durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen mit sehr kleinen mittleren Partikeldurchmessern (z -average < 70 nm) beobachtet (Abb. 4.4.14). Es könnte sich hierbei um die Bildung neuer kolloidaler Strukturen durch den Energieeintrag durch mehrfaches Aufschmelzen bzw. durch Zentrifugation handeln. Denkbar wäre beispielsweise eine Fusion kleiner Phospholipidvesikel, in deren Bilayer Cholesterylmyristat eingelagert ist, zu größeren Phospholipidstrukturen und/oder Bildung kleinerer Emulsionspartikel.

4.4.2 Polyvinylalkohol (Mowiol)

Teilacetylierter Polyvinylalkohol (Mowiol 3-83) wurde in Konzentrationen von 1-5% für die Stabilisierung 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen eingesetzt. Da einige Dispersionen mit der wahrscheinlich verunreinigten Cholesterylmyristat-Charge hergestellt wurde (16_RT-20_RT*, A.2.1), erfolgte die Herstellung von drei weiteren Dispersionen mit einer anderen Cholesterylmyristat-Charge (S4-S6_RT).

Die mittleren Partikelgrößen (PCS) lagen nach Herstellung zwischen 120 und 210 nm mit Polydispersitätsindices von 0,08 bis 0,14. Die Volumenverteilung (LD-PIDS) war in allen Dispersionen zweigipflig mit D99-Werten < 470 nm. Alle Dispersionen erschienen nach der Herstellung homogen. Mit zunehmender Stabilisatorkonzentration nahm die mittlere Partikelgröße ab. Auffällig war die Zunahme des Polydispersitätsindices mit zunehmender Stabilisatorkonzentration (Abb. 4.4.19).

Alle Dispersionen waren über den Lagerungszeitraum hinsichtlich des makroskopischen Aussehens und der Partikelgröße stabil. Nur in der Dispersion mit der geringsten PVA-Konzentration (16_RT*, 1% PVA) wurde nach 12monatiger Lagerung ein kristalliner Cholesterylmyristat-Anteil von ca. 2% ermittelt. In den anderen Dispersionen konnten über den Beobachtungszeitraum von 12 (17-20_RT*) bzw. 9 (S4-S6_RT) Monaten keine rekristallisierten Anteile nachgewiesen werden.

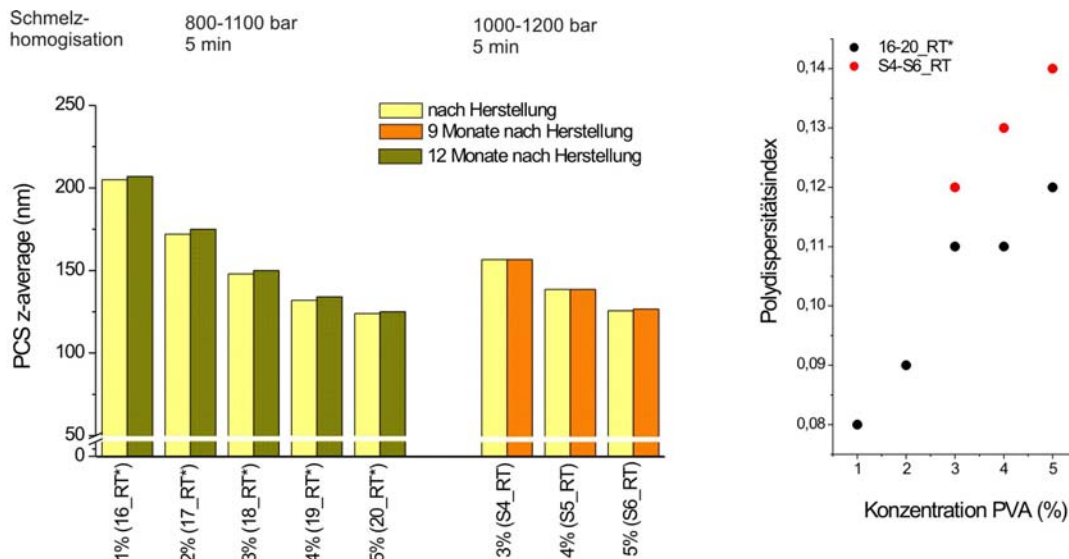


Abbildung 4.4.19: Links: Mittlere Partikelgröße (PCS) nach Herstellung und nach der Lagerung von 9 bzw. 12 Monaten 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen PVA stabilisiert wurden. Rechts: Polydispersitätsindex (Messung nach Herstellung der Dispersionen) in Abhängigkeit von der Stabilisatorkonzentration.

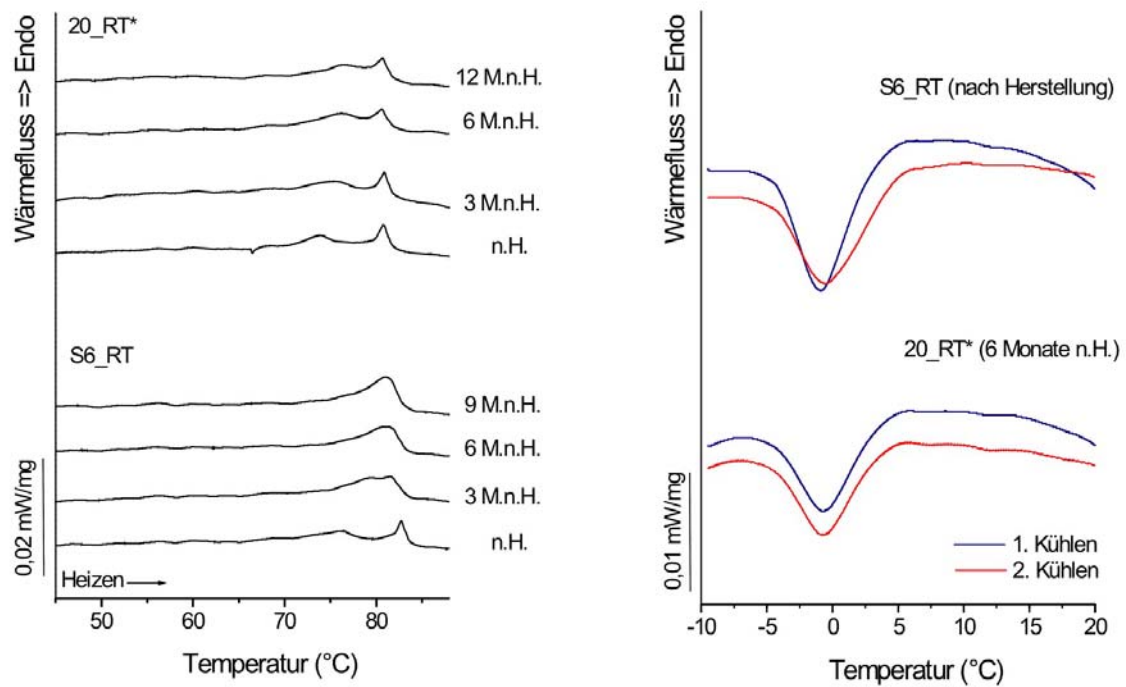


Abbildung 4.4.20: Links: Veränderungen der flüssigkristallinen Phasenübergänge über den Lagerungszeitraum. Gezeigt sind die Heizkurven der thermisch unbehandelten Dispersionen (1. Heizen, 5 °C/min). Rechts: Kühlkurven (5 °C/min) der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) und der vorher aufgeschmolzenen (2. Kühlen) Dispersionen.

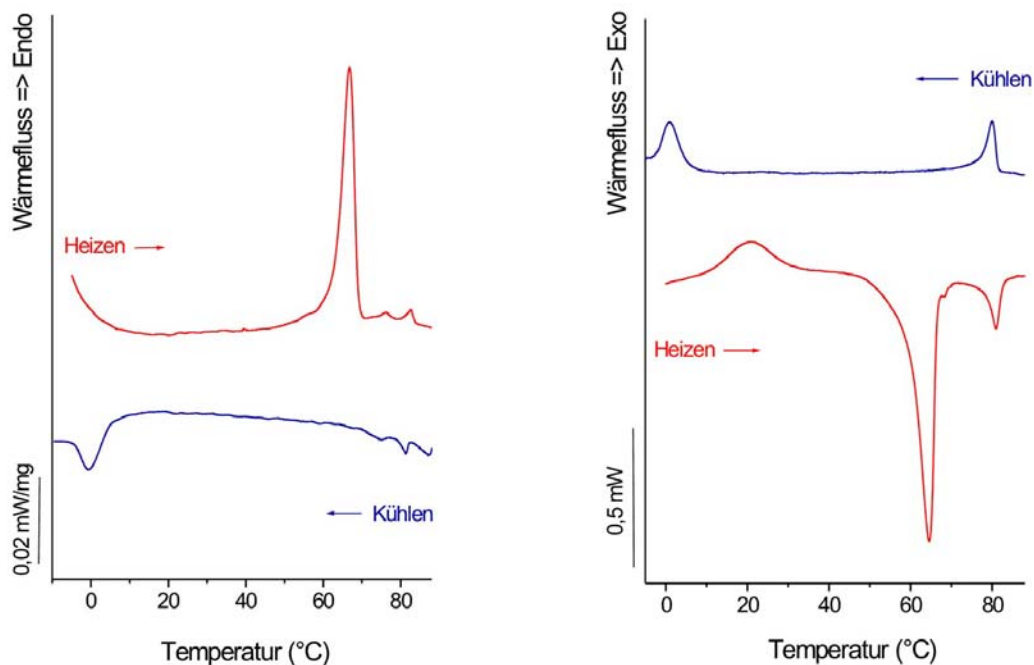


Abbildung 4.4.21: DSC-Heiz- und Kühlkurven von mit PVA stabilisierten 5%igen Cholesterylmyristat-Dispersion mit unterschiedlichen Scanraten. Links: Heiz-/Kühlrate 5 °C/min (Messung nach Herstellung, S6_RT, 5% PVA). Rechts: Heiz-/Kühlrate 0,5 °C/min (Messung 46 Monate nach Herstellung, S5_RT, 4% PVA). Gezeigt sind die Kühlkurven der vorher aufgeschmolzenen Dispersion sowie die anschließenden Heizkurven.

Das Phasenverhalten der Nanopartikel unterschiedlicher Cholesterylmyristat-Chargen unterschied sich nach Herstellung der Dispersionen nur geringfügig voneinander (Abb. 4.4.20). Die Phasenübergangstemperaturen der Nanopartikel der wahrscheinlich verunreinigten Cholesterylmyristat-Charge waren leicht zu tieferen Temperaturen verschoben (A.2.1). Über den Lagerungszeitraum kam es neben einer nur geringfügigen Verringerung der Schmelztemperatur der frisch kristallisierten Nanopartikel zu recht deutlichen Veränderungen der flüssigkristallinen Phasenübergänge, vor allem in den Dispersionen mit höherer Polymerkonzentration. Diese Veränderungen waren in den Dispersionen, die mit den unterschiedlichen Cholesterylmyristat-Chargen hergestellt wurden, nicht gleich. Insbesondere in den Dispersionen, die mit der nicht-verunreinigten Cholesterylmyristat-Charge hergestellt wurden (S4_RT – S6_RT), verschob sich der smektisch-cholesterische Phasenübergang zu höheren Temperaturen, während die Temperatur des cholesterisch-isotropen Übergangs abnahm, so dass in den Dispersionen mit 4 bzw. 5% PVA nach 6monatiger Lagerung nur noch ein flüssigkristalliner Phasenübergang beobachtet wurde (Abb. 4.4.20). Die Enthalpie dieses Phasenübergang entsprach der Summe der Einzelenthalpien der beiden flüssigkristallinen Phasenübergänge.

In den Kühlvorgängen wurde nur ein Kristallisationsereignis beobachtet, das von der thermischen Vorbehandlung unabhängig war (Abb. 4.4.20). Beim Abkühlen der aufgeschmolzenen Nanopartikel auf -10 bzw. -13 °C war in allen Dispersionen das Kristallisationsereignis sehr klein. Die Kristallisationsenthalpie betrug nur ca. 16-28% der Schmelzenthalpie des darauf folgenden Heizvorgangs. Bei einer sehr geringen Scanrate von 0,5 °C/min wurde beim Aufheizen der vorher auf -8 °C abgekühlten Dispersion (S5_RT) ein weiteres Kristallisationsereignis beobachtet (Abb. 4.4.21). Die Summe der Enthalpien beider Kristallisationsereignisse machten ca. 46% der Schmelzenthalpie aus. Das Phasenverhalten der Dispersion war vollständig reversibel. Bei jeweils 5maligem Abkühlen und Aufheizen (0,5 °C/min) kam es lediglich zu einer leichten Verschiebung des flüssigkristallinen Übergangs zu tieferen Temperaturen mit zunehmender Zahl der Heiz- bzw. Kühlzyklen.

Die mit Polyvinylalkohol stabilisierten Dispersionen zeigten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein homogeneres Erscheinungsbild im Vergleich zu Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden stabilisiert wurden. In den Cryo-Präparationen wurden keine instabilen, im Elektronenstrahl sofort verkochenden Partikel beobachtet. Die Partikel wiesen eine ovale, pflastersteinartige Gestalt auf (Abb. 4.4.22 A,B). Im Hintergrund wurden Domänen höheren Kontrasts beobachtet (Abb. 4.4.22 B), wobei es sich um wässrige Bereiche mit aufkonzentriertem Polymer handeln könnte. Die gefriergebrochenen, mit

Polyvinylalkohol stabilisierten Nanopartikel erschienen deutlich stärker strukturiert als mit Phospholipid stabilisierte Partikel (Abb. 4.4.22 C,D). Sie wiesen eine runde bis ovale Gestalt auf. Einige größere Partikel zeigten eine nicht einheitliche innere Struktur (Abb. 4.4.22 D). Des Weiteren erschien der Untergrund nicht glatt, was wahrscheinlich auf das in der Wasserphase gelöste Polymer zurückgeführt werden kann.

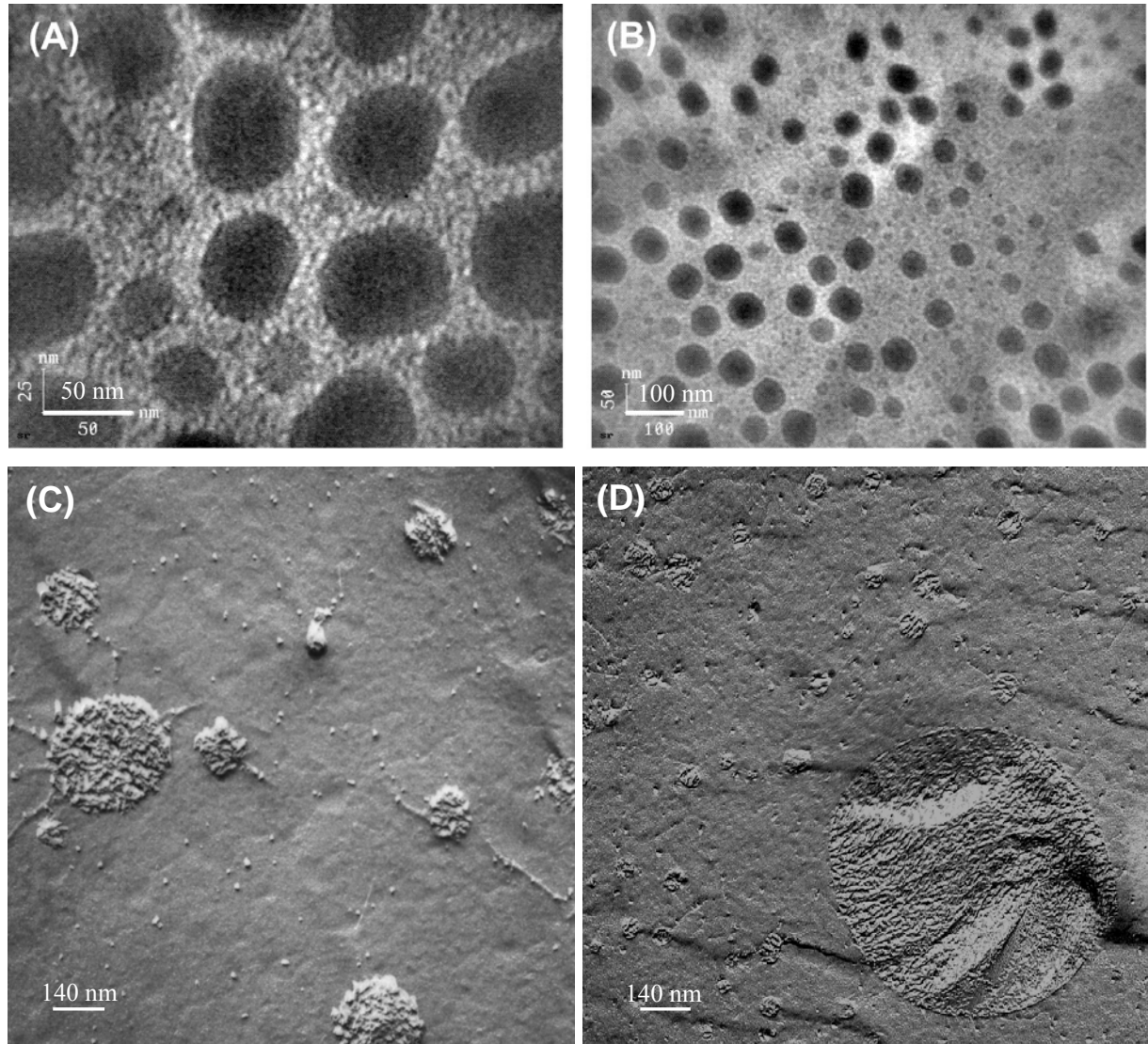
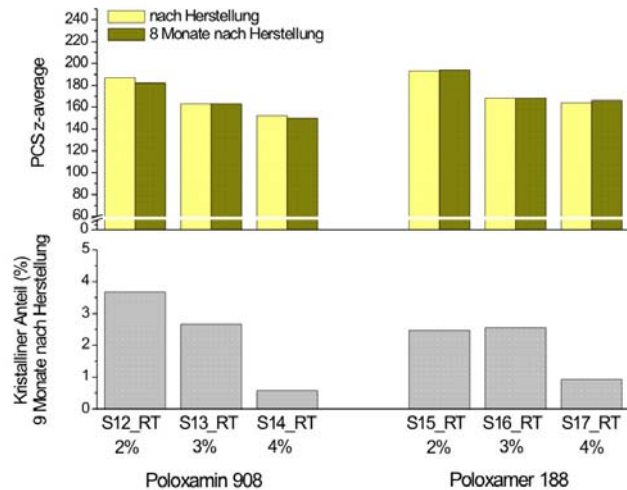


Abbildung 4.4.22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer mit Polyvinylalkohol stabilisierten Dispersion (S20_RT*, 5% CM, 5% PVA). (A) und (B) Cryo-Präparation, (C) und (D) Gefrierbruch-Replika.

4.4.3 Poloxamer und Poloxamin

Für die Stabilisierung wurde 2-4% Poloxamer 188 (S15_RT-S17_RT) bzw. Poloxamin 908 (S12_RT-S14_RT) eingesetzt. Die mittlere Partikelgröße (PCS) der schmelzhomogenisierten Dispersionen lag nach Herstellung zwischen 150 und 195 nm mit Polydispersitätsindizes von 0,10 bis 0,14. Die Volumenverteilung (LD-PIDS) war in allen Dispersionen zweigipflig mit D99-Werten ≤ 460 nm.

Auch in diesen Dispersionen wurde erwartungsgemäß mit steigender Polymerkonzentration eine leichte Abnahme der mittleren Partikelgröße beobachtet (vergleichbare Herstellungsbedingungen). Die Unterschiede zwischen den 3- und 4%igen Dispersionen waren jedoch sehr gering (Abb. 4.4.23).



Über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten wurden keine makroskopischen Veränderungen

Abbildung 4.4.23: Mittlere Partikelgröße (PCS) nach Herstellung und nach 9monatiger Lagerung (oben) sowie kristalline Anteile in den Dispersionen nach 9monatiger Lagerung.

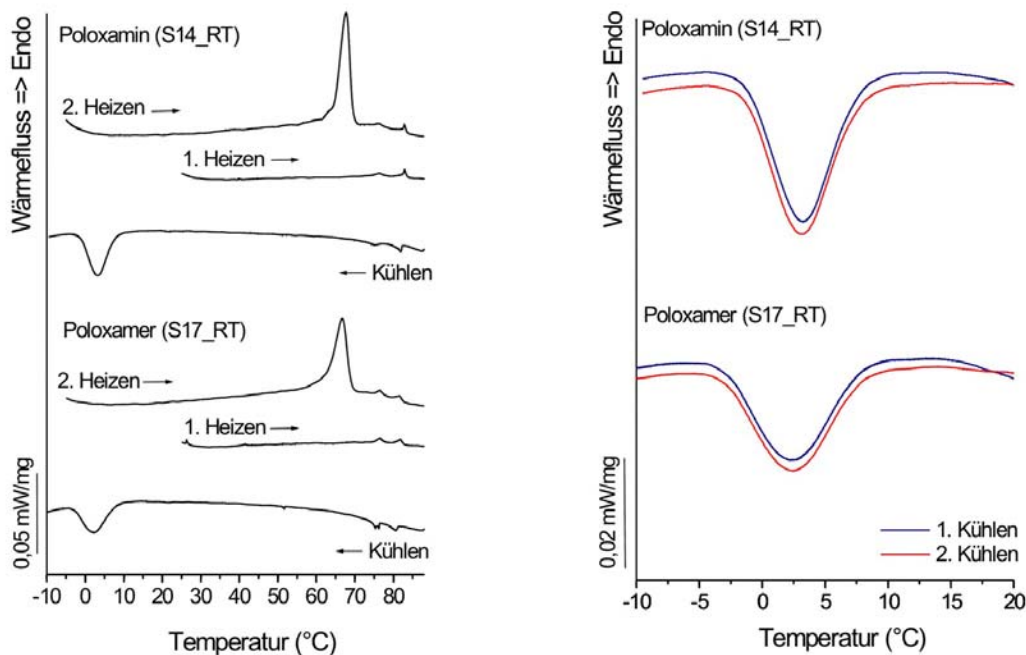


Abbildung 4.4.24: Links: DSC-Heiz- und Kühlkurven (5 °C/min) einer mit 4% Poloxamin (S14_RT) und einer mit 4% Poloxamer (S17_RT) stabilisierten Dispersion (Messung nach Herstellung). Rechts: DSC-Kühlkurven (5 °C/min) der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) und der vorher aufgeschmolzenen (2. Kühlen) Proben (S14_RT Messung nach Herstellung, S17_RT nach 5monatiger Lagerung).

und auch kein Partikelgrößenwachstum beobachtet. In allen Dispersionen kam es zu einer geringfügigen Rekristallisation der Nanopartikel, wobei nach 9monatiger Lagerung der rekristallisierte Anteil in allen Dispersionen unter 5% und in den Dispersionen mit der höchsten Stabilisatorkonzentration (4% Poloxamer bzw. Poloxamin) sogar unter 1% lag (Abb. 4.4.23). Nach längerer Lagerung (> 12 Monate) zeigten die mit Poloxamin stabilisierten Dispersionen eine leichte gelbliche Verfärbung.

Das Phasenverhalten von mit Poloxamer und mit Poloxamin stabilisierten Cholesterylmyristat-Dispersionen war sehr ähnlich (Abb. 4.4.24). In den Kühlvorgängen wurde nur ein Kristallisationsereignis beobachtet, das von der thermischen Vorbehandlung der Nanopartikel unabhängig war (Abb. 4.4.24). Über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten wurden keine deutlichen Veränderungen des Phasenverhaltens beobachtet.

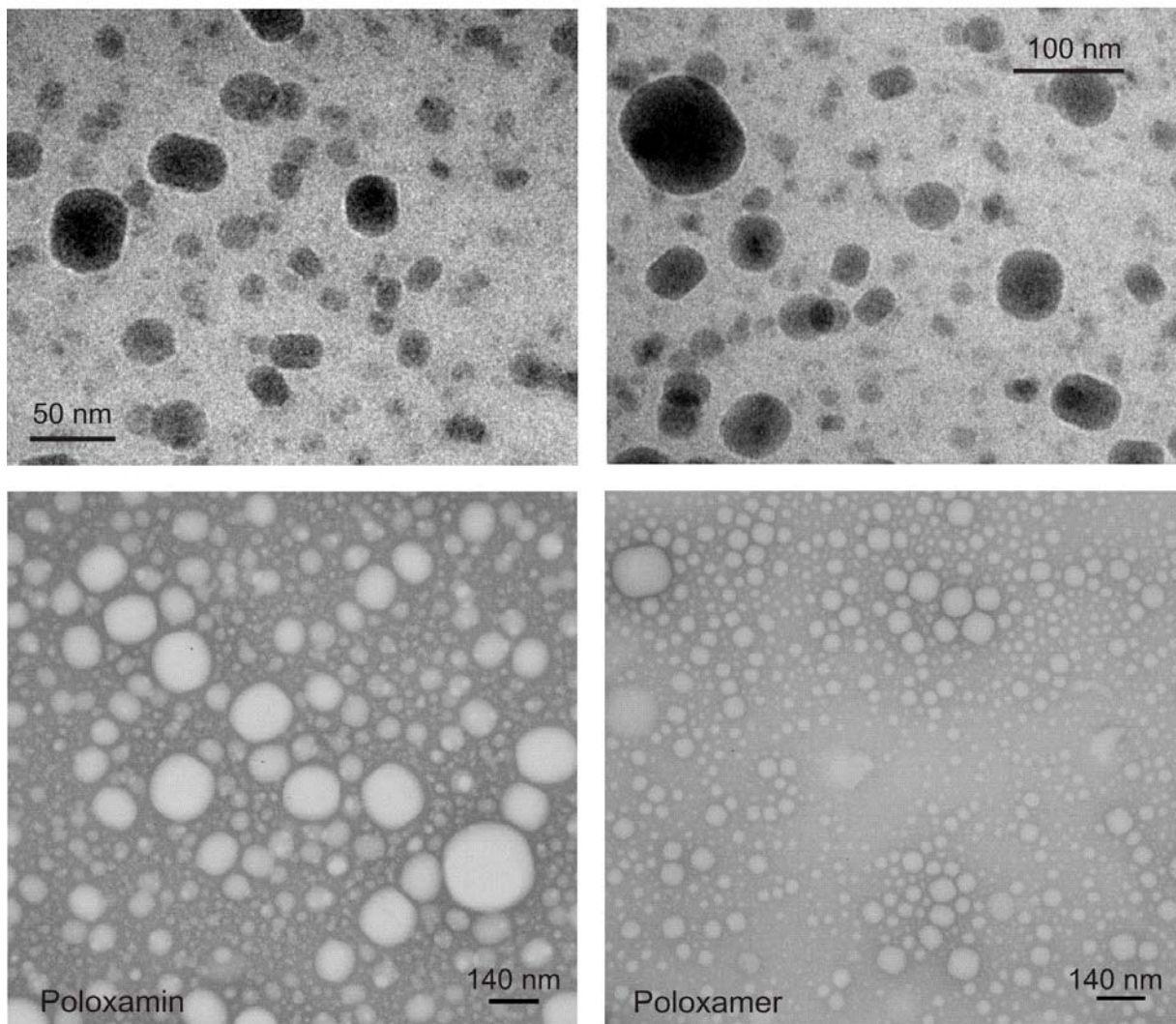


Abbildung 4.4.25: Oben: Cryo-ektronenmikroskopische Aufnahmen einer mit 4% Poloxamer stabilisierten Dispersion (S17_RT). Unten: Mit 4% Poloxamin bzw. 4% Poloxamer stabilisierte Dispersionen (S14_RT, S17_RT) in der Negativ-Kontrastierung.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit 4% Poloxamer und Poloxamin stabilisierten Dispersionen sind in Abbildung 4.4.25 gezeigt. Die Dispersionen erschienen homogen mit rundlichen bis pflastersteinartigen Partikeln. In der Cryo-Präparation der mit Poloxamer stabilisierten Dispersion wurden keine im Elektronenstrahl instabilen Partikel beobachtet. Die mit Poloxamin stabilisierte Dispersion wurde cryo-elektronenmikroskopisch nicht untersucht.

4.4.4 Gelatinepolysuccinat und Natriumcaseinat

Reine Gelatine konnte aufgrund der hohen Gelierungstendenz nur in geringen Konzentrationen von 1 bzw. 2% eingesetzt werden. Beide Dispersionen erschienen schon kurze Zeit nach der Herstellung makroskopisch nicht homogen.

Die mit 4% Gelatinepolysuccinat (S11_RT) sowie die mit 3 und 4% Natriumcaseinat (S7_RT, S8_RT) stabilisierten Dispersionen erschienen nach der Herstellung homogen. Die mittleren Partikelgrößen (PCS) betrugen 156, 187 und 184 nm für die mit Gelatinepolysuccinat sowie für die mit 3 bzw. 4% Natriumcaseinat stabilisierten Dispersionen. Die Polydispersitätsindices lagen zwischen 0,10 und 0,13. Die Volumenverteilung (LD-PIDS) war in allen Dispersionen zweigipflig mit D99-Werten < 450 nm.

Die Dispersionen waren über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten hinsichtlich des makroskopischen Aussehens und der Partikelgröße stabil. In allen drei Dispersionen kam es

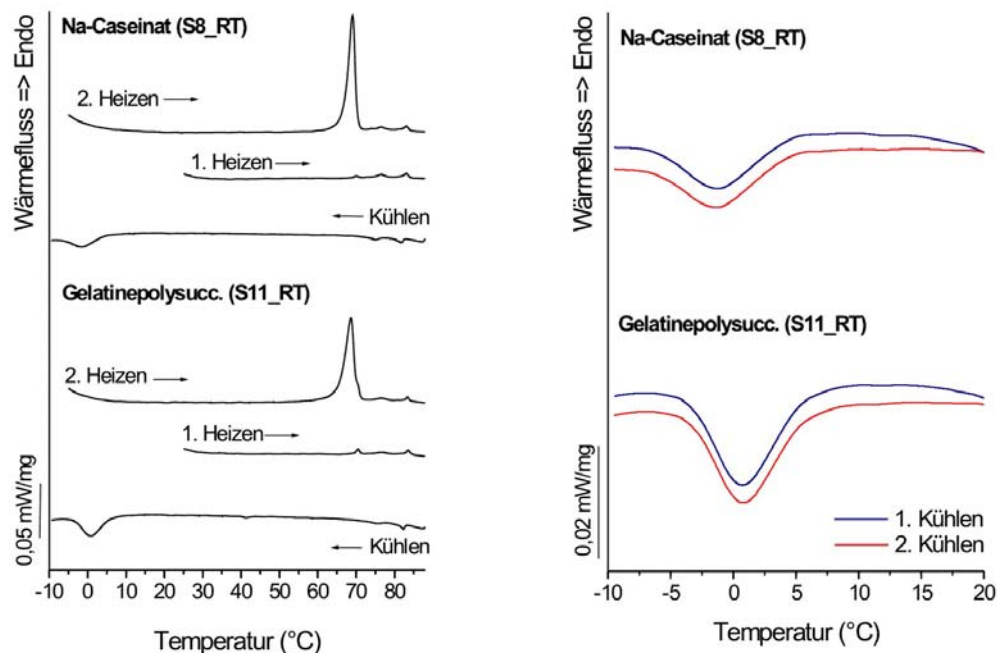


Abbildung 4.4.26: Links: DSC-Heiz- und Kühlkurven (5 °C/min) der mit 4% Natrium-Caseinat (S8_RT) bzw. 4% Gelatinepolysuccinat (S11_RT) stabilisierten Dispersionen (Messung nach Herstellung). Rechts: DSC-Kühlkurven (5 °C/min) der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) und der vorher aufgeschmolzenen (2. Kühlen) Proben (Messung nach Herstellung).

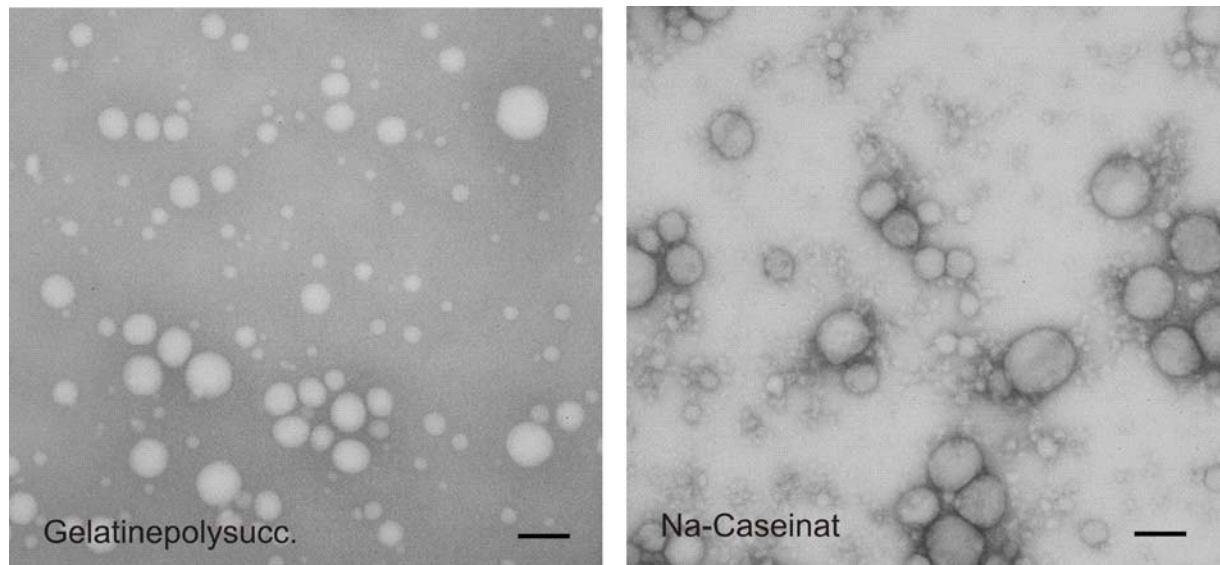


Abbildung 4.4.27: Mit 4% Gelatinepolysuccinat (S11_RT) bzw. Na-Caseinat (S8_RT) stabilisierte Dispersionen in der Negativ-Kontrastierung (Balken 140 nm).

zu einer geringfügigen Rekristallisation. Der rekristallisierte Anteil lag jedoch deutlich unter 5%.

In den Kühlvorgängen der DSC-Untersuchungen wurde in allen Dispersionen nur ein Kristallisationsereignis beobachtet, das von der thermischen Vorbehandlung der Proben unabhängig war (Abb. 4.4.26). Über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten wurden keine deutlichen Veränderungen im Phasenverhalten beobachtet.

Die mit Gelatinepolysuccinat bzw. Natriumcaseinat stabilisierten Nanopartikel erschienen in der Negativ-Kontrastierung rundlich bis oval (Abb. 4.4.27). In der mit Natriumcaseinat stabilisierten Dispersion waren außerdem zahlreiche kleine Strukturen zu erkennen, bei denen es sich um Casein-Submizellen handeln könnte.

4.4.5 Tween 80

Eine 5%ige Cholesterylmyristat-Dispersion wurde mit 4% Tween 80 stabilisiert (S19_RT). Tween 80 weist einen Trübungspunkt deutlich unter 100 °C auf, so dass beim Erwärmen der wässrigen Phase auf 95 °C eine leichte Trübung beobachtet wurde. Durch Hochdruckhomogenisation wurde jedoch eine homogene weiße Dispersion mit einer mittleren Partikelgröße (PCS) von 156 nm (PI = 0,10) erhalten. Die Volumenverteilung (LD-PIDS) war zweigipflig mit einem D99-Wert von 402 nm.

Die Dispersion war über den Beobachtungszeitraum von 8 Monaten hinsichtlich des makroskopischen Aussehens und der mittleren Partikelgröße stabil. Die Rekristallisations-

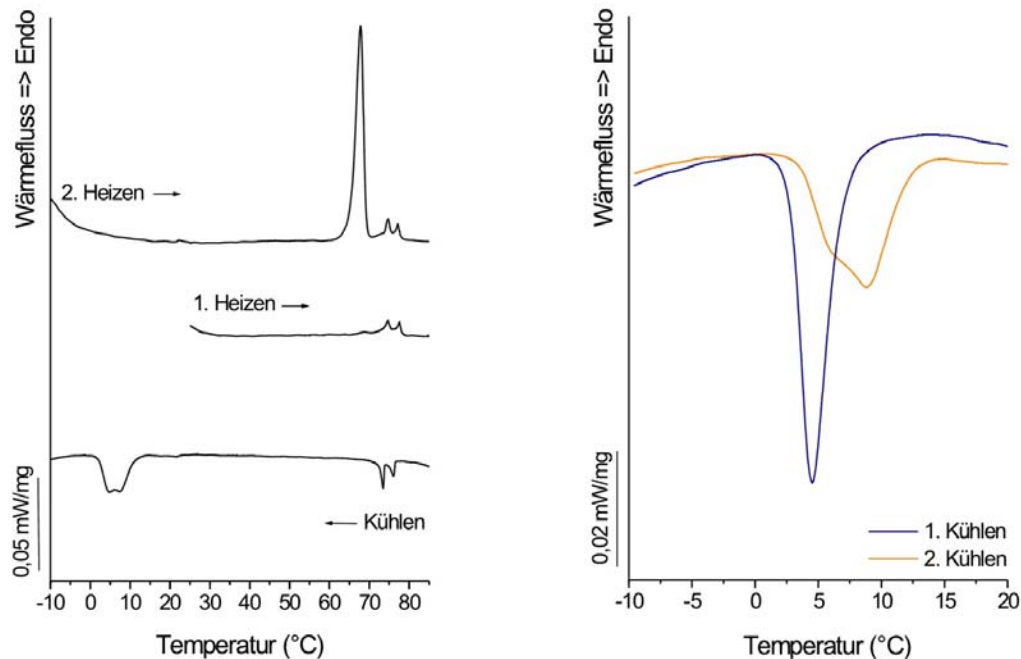


Abbildung 4.4.28: DSC-Kurven (5 °C/min) einer mit 4% Tween 80 stabilisierten 5%igen Cholesterylmyristat-Dispersion. Links: Heiz- und Kühlkurven einer Messung nach 5monatiger Lagerung der Dispersion. Rechts: Kühlkurven der thermisch unbehandelten (blau) und der vorher aufgeschmolzenen (rot) Dispersion (Messung nach Herstellung).

tendenz war sehr gering. Nach 8monatiger Lagerung wurde ein kristalliner Cholesterylmyristat-Anteil von 0,8% ermittelt.

Während bei der Kristallisation der Originaldispersion (1. Kühlen) nur ein scharfes Kristallisationsereignis mit einer Onset-Temperatur von 6,9 °C beobachtet wurde, kam es im 2. Kühlvorgang (aufgeschmolzene Nanopartikel) zu einer Schulterbildung und das Kristallisationsereignis war zu höheren Temperaturen verschoben (Onset 12,2 °C, Abb. 4.4.28).

Abbildung 4.4.29 zeigt die cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit Tween stabilisierten Dispersion (S19_RT). Neben eckigen Partikeln, die im Vergleich zu den mit Phospholipid stabilisierten Partikeln eine mehr „ausgebuchtete“ Form aufwiesen, wurden auch runde Partikel beobachtet. Da die runden Partikel keine deutlich stärkere Instabilität gegenüber dem Elektronenstrahl aufwiesen als die eckigen, sollte es sich bei den runden Strukturen um zylinderförmige Partikel in der Aufsicht handeln. Neben den Emulsionspartikeln war eine Vielzahl sehr kleiner Strukturen sichtbar, wobei es sich um Mizellen des Tweens handeln könnte.

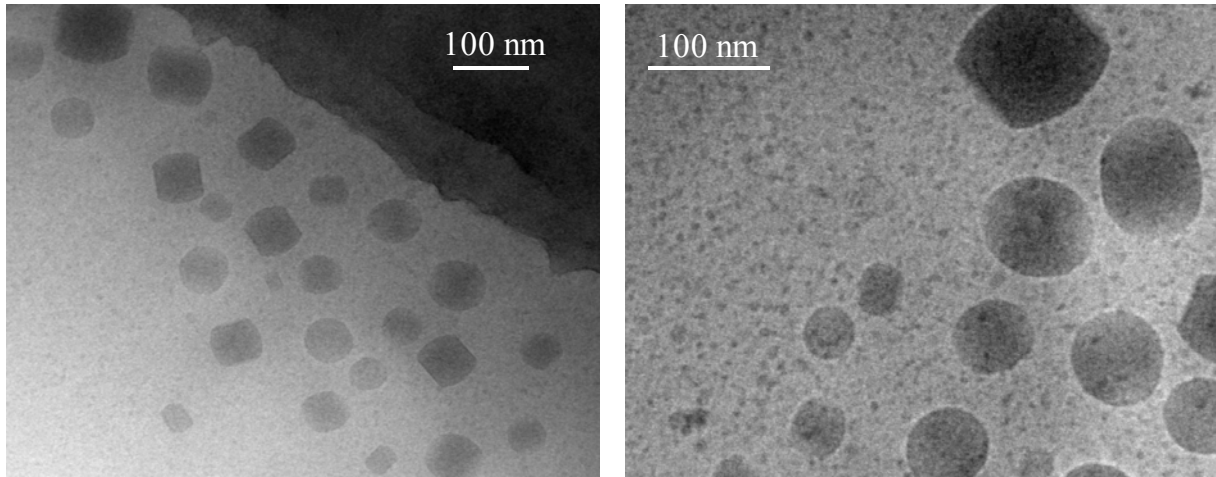


Abbildung 4.4.29: Cryo-TEM Aufnahmen einer mit Tween 80 stabilisierten Dispersion (S19_RT, 5% CM, 4% Tween 80).

Durch Drehen des Probengrids im Elektronenmikroskop können ein und dieselben Partikel in unterschiedlichen Ausrichtungen betrachtet werden. In Abbildung 4.4.30 wird deutlich, dass die beiden in (1) rundlich erscheinenden Cholesterylmyristat-Partikel bei Änderung des Betrachtungswinkels eine immer stärkere Abweichung von der runden Gestalt zeigen. In (4) und (5) sind schließlich zylinderförmige Partikel in der Seitenansicht zu sehen. Im Unterschied dazu weist das anfänglich in (1) zylinderförmig erscheinende Partikel bei Änderung des Betrachtungswinkels eine zunehmend runde Form auf.

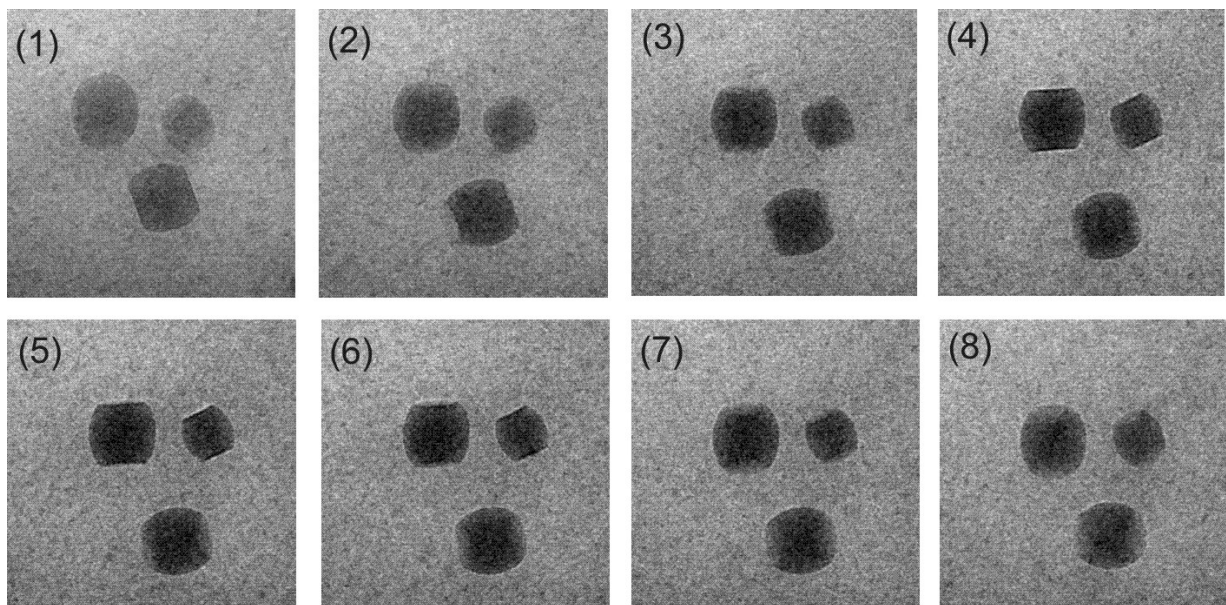


Abbildung 4.4.30: Zylinderförmige Partikel in unterschiedlicher Ansicht in einer Cryo-Präparation (Dispersion S19_RT) in Abhängigkeit vom Betrachtungswinkel.

4.4.6 Natriumoleat

Natriumoleat wurde als alleiniger Emulgator verwendet, um den Einfluss der Fettsäureketten des Stabilisators auf das Kristallisationsverhalten von Cholesterylmyristat-Nanopartikeln näher zu untersuchen. Die mit 4% Natriumoleat stabilisierte Dispersion (S18_RT) wies nach der Hochdruckhomogenisation einen PCS z-average von 150 nm und einen PI von 0,11 auf. Die Partikelgrößen-Volumenverteilung (LD-PIDS) war zweigipflig mit einem D99-Wert von 412 nm.

Über den Lagerungszeitraum kam es in den PCS-Messungen zu einer leichten Partikelgrößenzunahme. Nach 9monatiger Lagerung wurden ein z-average von 159 nm und ein Polydispersitätsindex von 0,17 gemessen. Im Gegensatz dazu wurden in den LD-PIDS-Messungen keine Veränderungen der Partikelgröße detektiert (Mean 136 nm nach Herstellung und 137 nm nach 9monatiger Lagerung). Die Rekristallisationstendenz der Dispersion war hoch. In der DSC wurde nach 9monatiger Lagerung ein kristalliner Anteil von 13% in der Dispersion ermittelt, so dass die größeren mittleren Partikeldurchmesser (PCS) wahrscheinlich auf die Anwesenheit einer relativ großen Anzahl kristalliner Nanopartikel zurückzuführen sind.

Die kristallisierten Nanopartikel zeigten ein ausgeprägtes multiples Schmelzverhalten, das über den gesamten Beobachtungszeitraum gut reproduzierbar war. Der smektisch-cholesterische Übergang erschien oft als flache Schulter des cholesterisch-isotropen Phasenübergangs. In allen DSC-Messungen wurde beim 1. Aufheizen der Dispersionen (Originalprobe) ein Abfall der Basislinie bei ca. 45 °C beobachtet. Bei höheren Temperaturen kam es dann wieder zu einem Anstieg der Basislinie (Abb. 4.4.31).

Das Kristallisationsverhalten der mit Natriumoleat stabilisierten Nanopartikel war zweigipflig und vergleichbar mit dem von Nanopartikeln, die auf der Basis von Phospholipiden stabilisiert wurden (Abb. 4.4.31). Das Hauptkristallisationsereignis war bei der Kristallisation der thermisch unbehandelten Probe (1. Kühlen) im Vergleich zu der Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Probe zu tieferen Temperaturen verschoben (Onset 2,3 °C vs. 4,2 °C). Weiterhin kam es über den Lagerungszeitraum zu einer Abnahme der Fläche des Kristallisationspeaks bei höheren Temperaturen. Nach Herstellung betrug die Fläche unter dem Kristallisationspeak bei höheren Temperaturen ca. 50%, nach 9monatiger Lagerung nur noch ca. 33% der Gesamtkristallisationsenthalpie bei der Kristallisation der thermisch unbehandelten Dispersion (1. Kühlen). Auch im 2. Kühlvorgang (vorher aufgeschmolzene Partikel) nahm die Fläche unter dem Kristallisationspeak bei höheren Temperaturen mit zunehmender Lagerungszeit ab (50,6% nach Herstellung und 32,8% nach Lagerung).

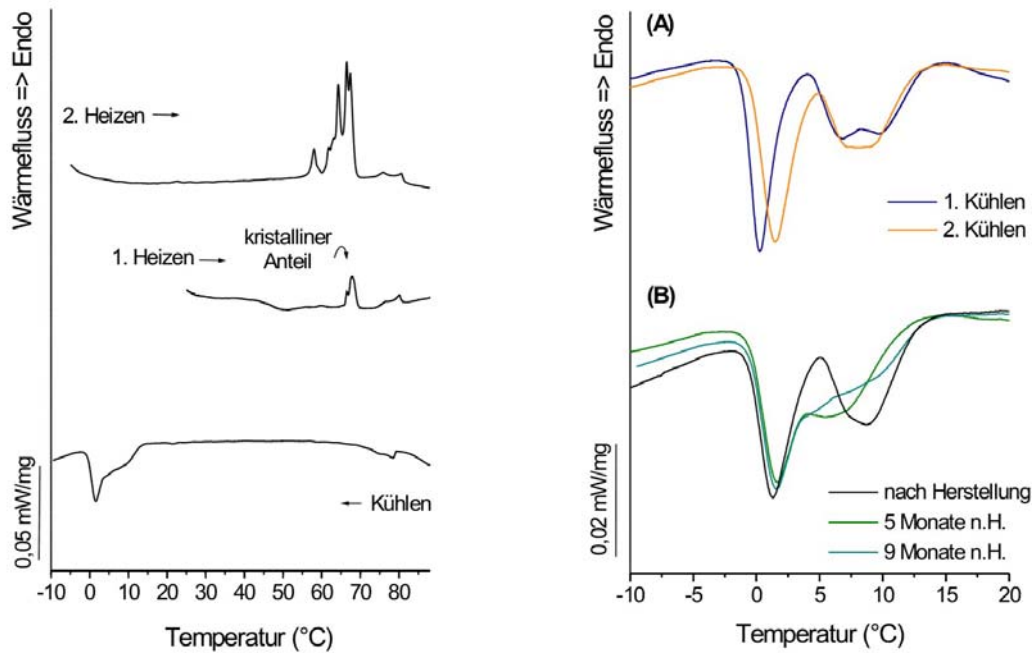


Abbildung 4.4.31: DSC-Kurven (5 °C/min) einer mit 4% Natriumoleat stabilisierten 5%igen Cholesterylmyristat-Dispersion. Links: Heiz- und Kühlkurven einer Messung nach 9monatiger Lagerung der Dispersion. Rechts: (A) Kühlkurven der thermisch unbehandelten (blau) und der vorher aufgeschmolzenen (rot) Dispersion (Messung nach Herstellung) und (B) Veränderung des Kristallisationsverhaltens der vorher aufgeschmolzenen Proben über den Lagerungszeitraum.

Die mit Natriumoleat stabilisierte Dispersion zeigte ähnlich wie die phospholipidstabilisierten Dispersionen eine Vielzahl kolloidaler Strukturen (Abb. 4.4.32). Neben runden und eckigen stabilen Partikeln wurden sehr instabile, im Elektronenstrahl sofort verkochende Partikel beobachtet (Abb. 4.4.32 C). Auch die Form der Partikel (zylinderförmige Partikel) ist denen der mit Phospholipiden stabilisierten Cholesterylmyristat-Partikel sehr ähnlich. Neben den relativ gleichmäßig kontrastierten Emulsions-Partikeln sind Vesikel und fadenförmige Gebilde zu erkennen. In Abbildung 4.4.32 A ist links unten ein Partikel mit gleichmäßigem Kontrast und sehr kontrastreicher Begrenzung zu erkennen. Der gleichmäßige Kontrast weist auf ein Emulsionspartikel hin. Für Emulsionspartikel wurde jedoch im Allgemeinen keine so stark kontrastierte Begrenzung beobachtet. Die starke Kontrast ist typisch für Bilayerstrukturen. Ähnliche Strukturen wurden in einer cryo-elektronenmikroskopischen Untersuchung von wässrigen Ölsäure-Dispersionen (3,6 mM) bei einem pH-Wert von 8,8 beobachtet [Edwards et al. 1995]. In Abbildung 4.4.32 D ist ein plättchenförmiges Partikel zu erkennen, bei dem es sich wahrscheinlich um ein kristallines Cholesterylmyristat-Partikel handelt.

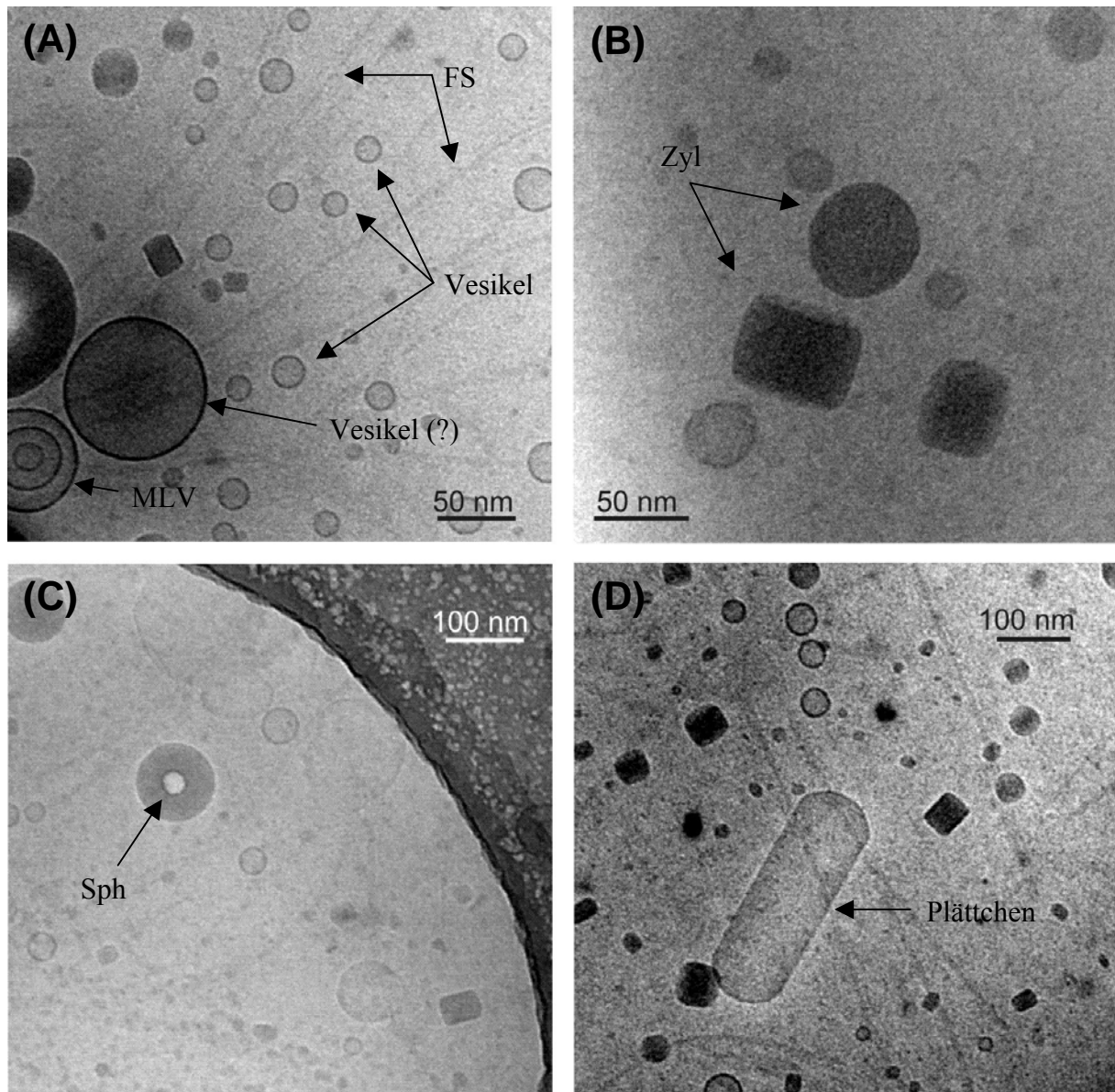


Abbildung 4.4.32: Cryo-TEM Aufnahmen einer mit Natriumoleat stabilisierten Dispersion (S18_RT, 5% CM, 4% Natriumoleat). Folgende Strukturen sind in der Abbildung markiert:

Zyl – smektische Partikel mit zylinderförmiger Gestalt, Sph – sehr instabile Emulsionspartikel mit wahrscheinlich sphärischer Gestalt, Plättchen – wahrscheinlich ein kristallines Cholesterylmyristat-Partikel, Vesikel, MLV – multilamellares Vesikel, FS – fadenförmige Strukturen.

4.4.7 Zuckertensid

Eine Dispersion wurde mit 4% eines Saccharoseesters, der hauptsächlich Saccharose-monolaurat enthielt, stabilisiert (S20_RT). Nach der Schmelzhomogenisation erschien die Dispersion homogen und wies eine mittlere Partikelgröße (PCS) von 170 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,09 auf. Die Partikelgrößen-Volumenverteilung (LD-PIDS) war zweigipflig mit einem D99-Wert von 421 nm.

Über den Lagerungszeitraum wurden makroskopisch keine Veränderungen festgestellt. Die Partikelgrößenmessungen ergaben jedoch eine kontinuierliche Zunahme der mittleren Partikelgröße sowohl in den PCS- als auch in den LD-PIDS-Messungen über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten (Abb. 4.4.33). Nach 9monatiger Lagerung wurde in den LD-PIDS-Messungen ein D99-Wert von 554 nm ermittelt.

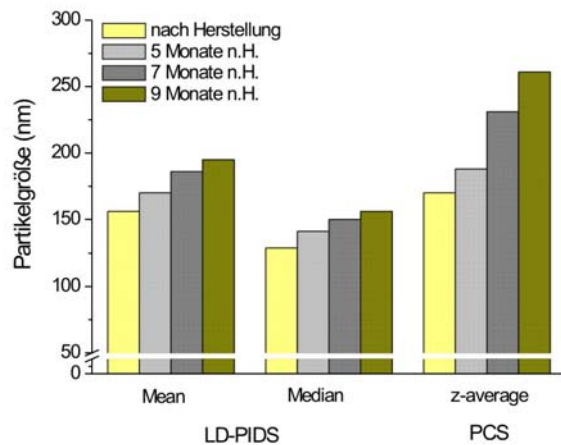


Abbildung 4.4.33: Mittlere Partikelgrößen (PCS und LD-PIDS) der mit Zuckerester stabilisierten Dispersion (S20_RT) über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten.

Die Rekristallisationstendenz der mit dem Zuckerester stabilisierten Nanopartikel war sehr hoch. Nach 9monatiger Lagerung lag der kristalline Cholesterylmyristat-Anteil bei 45%.

Die mit Saccharoseester stabilisierten Nanopartikel zeigten ein dreigipfliges Kristallisationsverhalten. Die Kristallisation war abhängig von der thermischen Vorbehandlung (Abb. 4.4.34). Die vorher aufgeschmolzene Probe zeigte einen geringeren bei höheren Temperaturen kristallisierenden Anteil. Des Weiteren änderte sich das

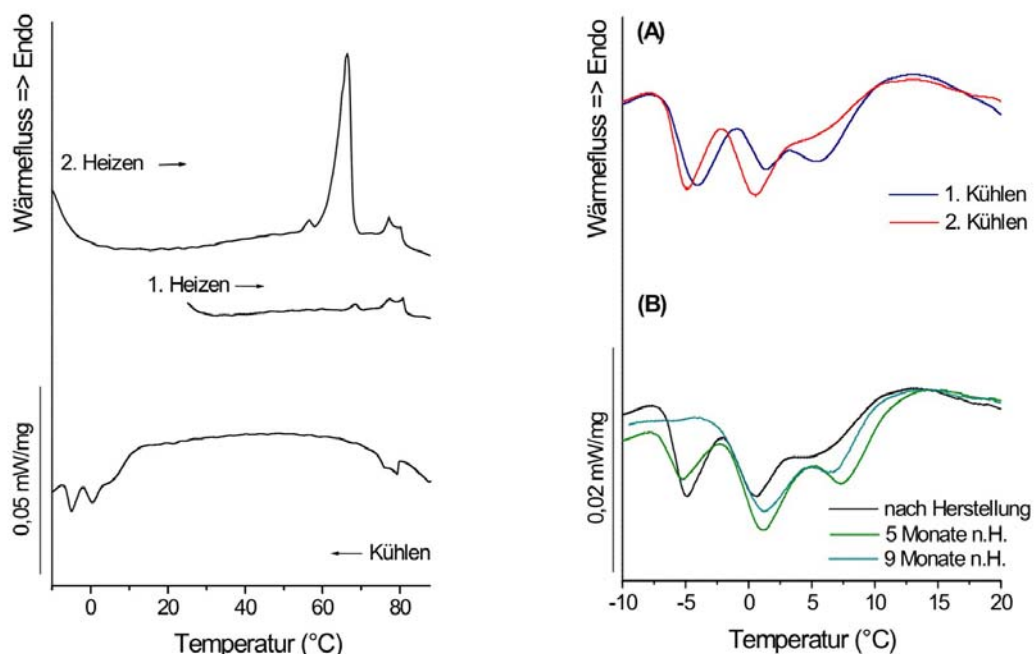


Abbildung 4.4.34: DSC-Kurven (5 °C/min) einer mit 4% Saccharoseester stabilisierten 5%igen Cholesterylmyristat-Dispersion. Links: Heiz- und Kühlkurven einer Messung nach Herstellung der Dispersion. Rechts: (A) Kühlkurven der thermisch unbehandelten (blau) und der vorher aufgeschmolzenen (rot) Dispersion (Messung nach Herstellung) und (B) Veränderung des Kristallisationsverhaltens der vorher aufgeschmolzenen Proben über den Lagerungszeitraum.

Kristallisationsverhalten der jeweils vorher aufgeschmolzenen Nanopartikel mit dem Alter der Dispersion. Der Anteil der bei höheren Temperaturen kristallisierenden Partikel nahm über den Lagerungszeitraum zu. Nach 9monatiger Lagerung wurde nur noch ein zweigipfliges Kristallisationsgeschehen beobachtet (Fehlen des Kristallisationsereignisses bei tiefen Temperaturen, Abb. 4.4.34), was vielleicht auf das deutliche Partikelgrößenwachstum zurückgeführt werden kann.

4.4.8 Natriumglycocholat

Natriumglycocholat wurde als alleiniger Stabilisator in Konzentrationen von 1, 1,5 und 2% eingesetzt (S1-S3_RT), um den Einfluss des Natriumglycocholats in der Kombination mit Phospholipiden auf das Phasenverhalten der Cholesterylmyristat-Nanopartikel abschätzen zu können.

Nach der Schmelzhomogenisation erschienen die Dispersionen homogen und wiesen mittlere Partikelgrößen (PCS) von 145 nm (1% NaGC) und 136 nm (1,5% und 2% NaGC) mit Polydispersitätsindices zwischen 0,12 bis 0,14 auf. Die Volumenverteilungen (LD-PIDS) waren zweigipflig mit D99-Werten < 400 nm.

Die Dispersionen waren über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten stabil hinsichtlich des makroskopischen Aussehens, der Partikelgröße und des smektischen Zustandes der

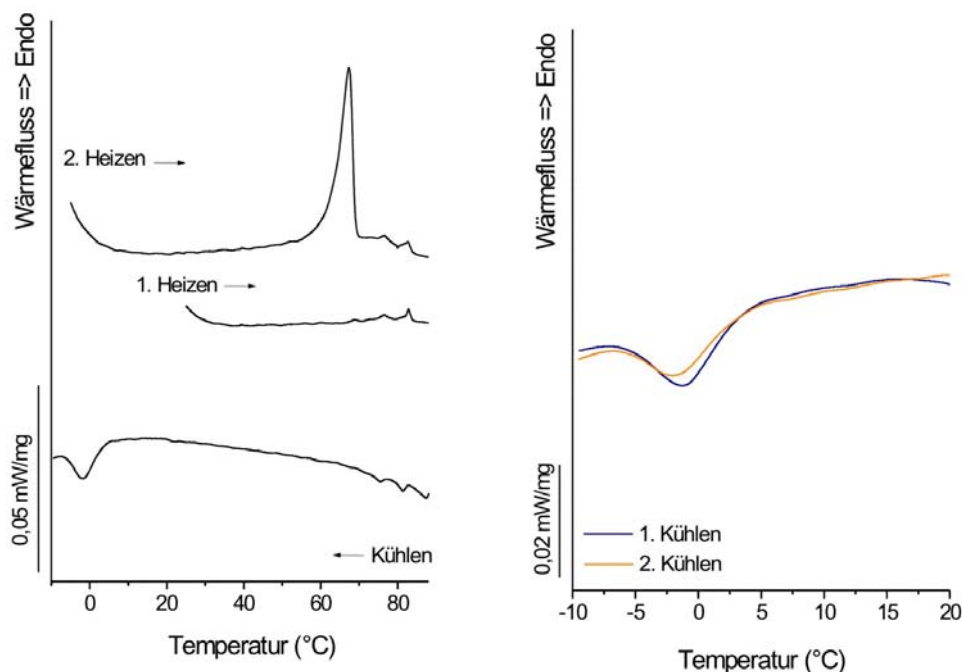


Abbildung 4.4.35: Links: DSC-Heiz- und Kühlkurven (5 °C/min) der mit 2% Natriumglycocholat stabilisierten Dispersion (S3_RT, Messung nach Herstellung). Rechts: DSC-Kühlkurven (5 °C/min) der thermisch unbehandelten (1. Kühlen) und der vorher aufgeschmolzenen (2. Kühlen) Dispersion (Messung nach Herstellung).

Nanopartikel. Die Rekristallisationstendenz war sehr gering. Nur in der mit 2% Gallensalz stabilisierten Dispersion wurde nach 9monatiger Lagerung ein kristalliner Anteil von 0,7% ermittelt.

Nach längerer Lagerung wurde nur noch ein flüssigkristalliner Übergang mit einem sehr langen Anstieg beobachtet. Weiterhin kam es zu einer Abnahme der Kristallisationsenthalpie über den Beobachtungszeitraum. Betrug der Anteil der Kristallisationsenthalpie an der Enthalpie des nachfolgenden Schmelzvorgangs bei der Messung nach Herstellung der Dispersionen 41, 24 bzw. 22% für die mit 1, 1,5 bzw. 2% Gallensalz stabilisierten Dispersionen, so lag dieser Anteil nach 9monatiger Lagerung nur noch bei 26, 19 bzw. 19%. Es wurde nur ein Kristallisationsereignis beobachtet, das von der thermischen Vorbehandlung unabhängig war (Abb. 4.4.35).

Smektische Cholesterylmyristat-Partikel, die mit Natriumglycocholat stabilisiert wurden (S3_RT), zeigten eine recht einheitliche Struktur mit nicht-sphärischer, tönchchenförmiger Gestalt (Abb. 4.4.36). Da auch in dieser Dispersion keine gegenüber dem Elektronenstrahl sehr instabilen Partikel beobachtet wurden, dürfte es sich bei den runden Strukturen um die nicht-sphärischen Partikel in der Aufsicht handeln.

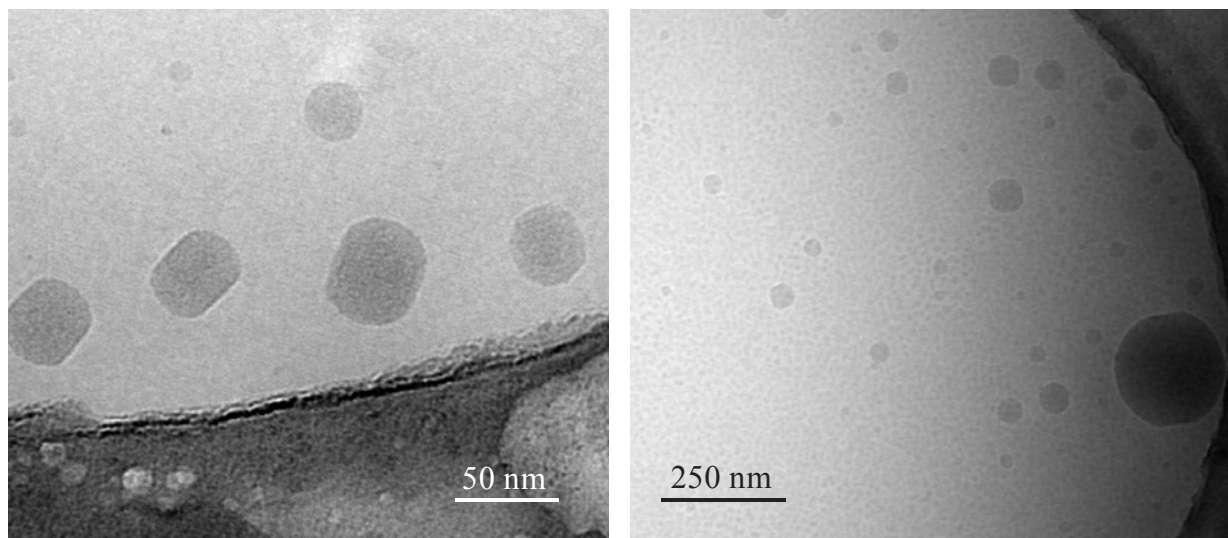


Abbildung 4.4.36: Cryo-TEM Aufnahmen einer mit Natriumglycocholat stabilisierten Dispersion (S3_RT, 5% CM, 2% NaGC).

4.4.9 Einfluss des Stabilisatorsystems auf die Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Lage des für die smektische Phase charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflexes wurde durch die Art und die Konzentration des Stabilisators der Nanopartikel nicht beeinflusst. Der Schichtabstand der smektischen Phase der bei 23 °C gelagerten Nanopartikel lag zwischen 34,8 und 35,3 Å. Im Mittel betrug der Schichtabstand $35,1 \pm 0,1$ Å ($n = 34$, s. A.3). Die Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren unterschieden sich jedoch in den Halbwertsbreiten des smektischen Reflexes. Der smektische Reflex der mit Polymeren sowie mit Tween 80 und Natriumglycocholat stabilisierten Dispersionen war schärfer im Vergleich zu denen der mit Phospholipiden, Natriumoleat und Zuckerester stabilisierten Dispersionen (Tab. 4.4.2), was vielleicht auf die homogenere Partikelstruktur in den erstgenannten Dispersionen zurückgeführt werden kann.

Für die kristallinen (im Kühlschrank gelagerten) Nanopartikel wurden Schichtabstände zwischen 49,8 und 51,2 Å gemessen. Im Mittel betrug der Schichtabstand $50,7 \pm 0,4$ Å ($n = 10$, A.3.3). Die mit Natriumoleat stabilisierten kristallinen Cholesterylmyristat-Nanopartikel zeigten zusätzliche kristalline Reflexe, die als Schulter bei kleineren Winkeln erschienen (Abb. 4.4.37). Die Ursache für das Auftreten dieser zusätzlichen Reflexe sind nicht klar. Sie könnten vielleicht auf eine in der Dispersion vorhandene Überstruktur hinweisen. Ähnliche

Tabelle 4.4.2: Lage und Breite der Röntgenkleinwinkelreflexe (s.a. Anhang A.3.3) der smektischen Nanopartikel in Abhängigkeit vom Stabilisatorsystem.

Dispersion	Stabilisator	PCS z-average nach Herstellung (nm)	Schichtabstand (nm)	Halbwertsbreite des smektischen Reflexes (Detektorkanäle)
A_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	185	35,1	36
M1_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	134	35,2	43
E_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	94	35,2	43
S22_RT	3,2% E80, 0,8% NaGC	162	35,1	25
S18_RT	4% Na-Oleat	150	35,1	45
S20_RT	4% Zuckerester	170	35,1	37
S19_RT	4% Tween 80	156	35,1	16
S3_RT	2% NaGC	136	35,0	24
19_RT*	4% PVA	132	35,1	24
S5_RT	4% PVA	139	34,9	24
S8_RT	4% Na-Caseinat	184	35,1	16
S11_RT	4% Gelatinepolysucc.	156	35,1	23
S17_RT	4% Poloxamer 188	164	35,1	20
S14_RT	4% Poloxamin 908	152	35,1	24

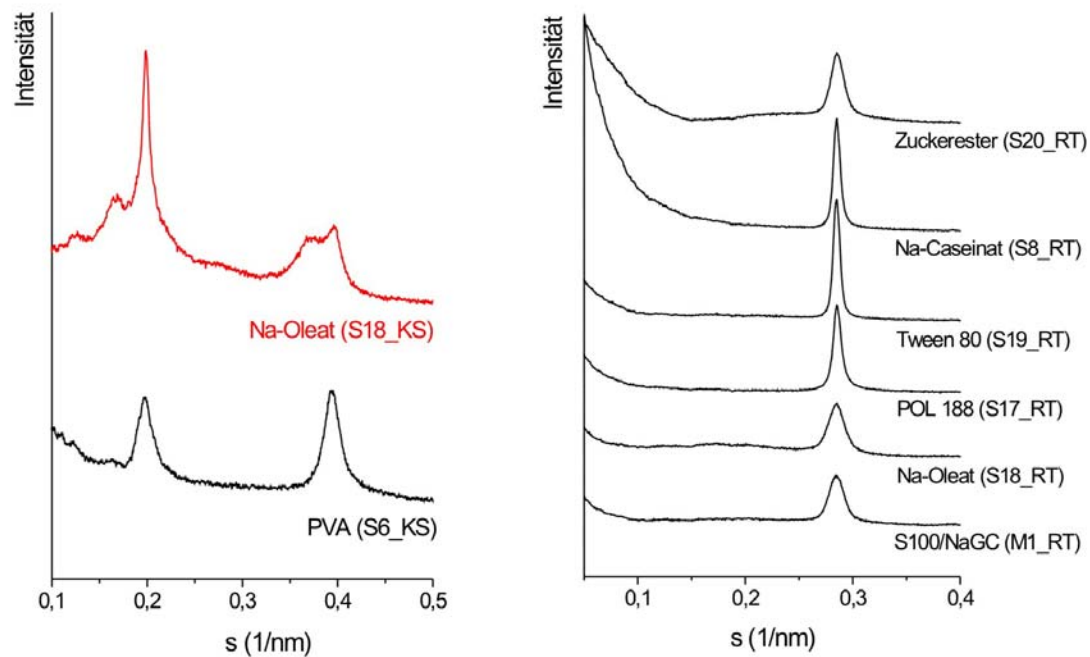


Abbildung 4.4.37: Röntgenkleinwinkel-Diffraktogramme ausgewählter 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren. Links: Kristalline Nanopartikel. Rechts: Smektische Nanopartikel.

Reflexe wurden in kolloidalen Tripalmitat-Dispersionen beobachtet, in denen es aufgrund der stark anisometrischen Gestalt der Partikel zur Ausbildung einer Überstruktur (stapelförmige Anordnung der Nanopartikel) kommt [Illing et al. 2004].

Wahrscheinlich aufgrund der in den Dispersionen vorhandenen zusätzlichen kolloidalen Strukturen (Mizellen, Liposomen) unterschieden sich die Kleinwinkelstreu曲ven der smektischen Nanopartikel teilweise deutlich voneinander. Eine charakteristische Röntgenkleinwinkelstreuung wurde insbesondere in den mit Natriumcaseinat und Zuckerester stabilisierten Dispersionen beobachtet (Abb. 4.4.37).

4.4.10 Zusammenfassung und Diskussion

Mit Ausnahme von reiner Gelatine sowie dem Zuckerester ergaben alle verwendeten Stabilisatoren stabile kolloidale Systeme.

Ultrastruktur

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weisen auf eine zumeist nichtsphärische Gestalt der kolloidalen smektischen Cholesterylmyristat-Partikel hin. Die Form der Partikel variierte dabei in Abhängigkeit vom Stabilisatorsystem von pflastersteinartig (Polymere) bis fast nahezu ideal zylinderförmig (Phospholipid und Natriumoleat, Abb. 4.4.38).

Bei Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden oder mittels Natriumoleat stabilisiert wurden, wurde in cryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine weitere, im

Elektronenstrahl sehr instabile Partikelfraktion beobachtet. Die in den Gefrierbruch-Replika beobachteten runden Strukturen mit einer Zwiebelschalen- bzw. Schichtstruktur weisen auf die sphärische Gestalt einiger Emulsionspartikel hin. Es scheint somit nahezuliegen, dass es sich bei den unterschiedlichen beobachteten Strukturen um zwei Partikelfraktionen handelt: eine Fraktion mit annähernd zylinderförmiger und eine Fraktion mit sphärischer Gestalt. Aufgrund der Schichtstruktur der smektischen Phase erscheint eine zylinderförmige Partikelgestalt energetisch günstiger als eine sphärische.

Die Modellvorstellungen zur inneren Struktur der sphärischen sowie zylinderförmigen Partikel sind in Abb. 4.4.38 schematisch dargestellt. In cryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen nativer Lipoproteine geringer Dichte (LDL), deren Lipidkern hauptsächlich aus Cholesterolestern besteht (Kapitel 2.1.4), wurde eine ähnliche nicht-sphärische Gestalt dieser Partikel beobachtet [van Antwerpen und Gilkey 1994, van Antwerpen et al. 1997]. Da die Probenpräparation

der LDL bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, dürften sich die Cholesterolester in der smektischen Phase befinden [Deckelbaum et al. 1977, Kroon 1981].

In den Gefrierbruch-Präparationen erschienen alle Emulsionspartikel strukturiert. Während die Zwiebelschalen- bzw. Schichtstruktur der sphärischen Partikel auf das Herausbrechen einzelner smektischer Schichten zurückgeführt werden kann, scheint die Strukturierung der zylinderförmigen Partikel nicht direkt durch die smektische Phase bedingt zu sein. Auch gefriergebrochene Emulsionstropfen unterkühlter Triglycerid- und Ubidecarenon-Schmelzen weisen häufig eine Strukturierung auf, wobei die Ubidecarenon-Partikel stärker strukturiert erschienen [Westesen et al. 2001, Hammer 2002]. Im Unterschied dazu waren gefriergebrochene Emulsionstropfen flüssiger Lipide, wie beispielsweise Sojaöl, häufig nicht so stark strukturiert [Férezou et al. 2001].

Mit Polyvinylalkohol stabilisierte smektische Nanopartikel zeigten in den Gefrierbruch-Präparationen eine deutlich stärkere innere Strukturierung im Vergleich zu den auf der Basis

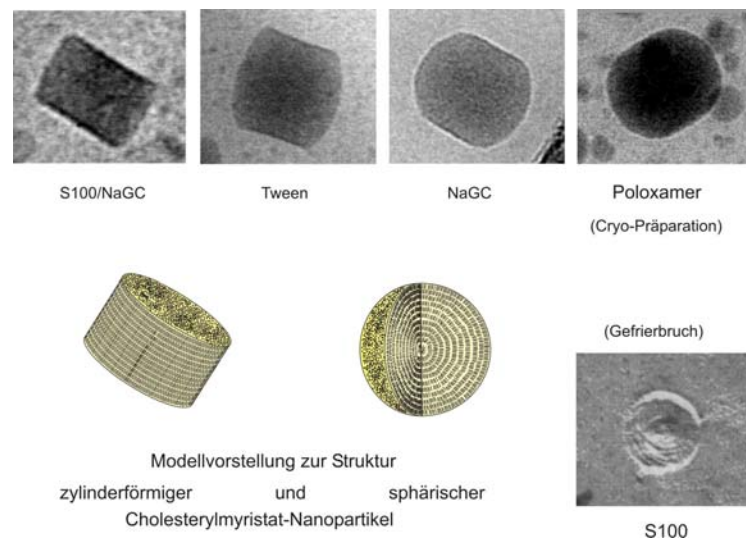


Abbildung 4.4.38: Partikelformen und Modellvorstellung zur Struktur smektischer Nanopartikel.

von Phospholipiden stabilisierten Partikeln. Die innere Struktur einiger größerer Cholesterylmyristat-Partikel scheint eine Kompartimentierung mit unterschiedlichen Strukturierungen des Lipid-Kerns aufzuweisen. In den Cryo-Präparationen sowie in der Negativ-Kontrastierung unterschieden sich die mit Polyvinylalkohol stabilisierten Nanopartikel nicht deutlich von den mit anderen Polymeren wie beispielsweise Poloxamer stabilisierten Partikeln. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eventuelle Besonderheiten der inneren Struktur von mit Polyvinylalkohol stabilisierten Cholesterylmyristat-Partikeln aufzuklären. Die in diesen Dispersionen beobachtete sehr geringe Kristallisationstendenz könnte vielleicht auf eine solche besondere innere Struktur der Nanopartikel zurückgeführt werden. Weiterhin war im Gefrierbruch der Untergrund nicht glatt, was wahrscheinlich auf das in der Wasserphase gelöste Polymer zurückzuführen ist. In Untersuchungen mit kolloidalen Trilaurat-Partikeln, die neben Phospholipid auch mit PVA stabilisiert wurden, wurden ähnliche Strukturen beobachtet [Schaal 2003], die mit zunehmender Konzentration von PVA (bis zu 10%) in den Dispersionen deutlicher ausgeprägt waren.

Bei 4 °C gelagerte, auf der Basis von Phospholipiden stabilisierte Cholesterylmyristat-Dispersionen (kristalline Partikel) zeigten neben länglichen, beinahe nadelförmigen Partikeln auch rundliche Plättchen (Abb. 4.4.11). Für Dispersionen kristalliner Triglycerid-Nanopartikel (z.B. Tripalmitat-Partikel), die durch Schmelzhomogenisation hergestellt wurden, wurde insbesondere bei alleiniger Stabilisierung mit Phospholipiden eine Gelbildungstendenz über den Lagerungszeitraum beschrieben [Westesen und Siekmann 1997, Siekmann 1994]. Die Gelierung der Dispersionen beim Abkühlen und bei der Kristallisation der Partikel wird auf die stark anisometrische Plättchenform der Partikel zurückgeführt, wobei es während der Kristallisation zu einer starken Oberflächenvergrößerung kommt. In den bei 4 °C gelagerten Cholesterylmyristat-Dispersionen (kristalline Partikel), die nur mit Phospholipiden stabilisiert wurden (5_KS, 6_KS, 5% Matrixlipid) wurde keine Gelbildung beobachtet. Allerdings enthielten diese Dispersionen nur 5% Cholesterolester und eine vergleichsweise hohe Konzentration an Phospholipiden (3,2%). Die Dispersionen erschienen auch nach dem Lagerungszeitraum von mehr als 3 Jahren makroskopisch unverändert, ausgenommen einer leichten gelblichen Verfärbung.

Neben den smektischen (Lagerung bei 23 °C) bzw. kristallinen (Lagerung bei 4 °C) Cholesterylmyristat-Partikeln wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Stabilisatorsystem verschiedene andere kolloidale Strukturen wie beispielsweise Mizellen und Vesikel beobachtet. Vor allem die mit Natriumoleat stabilisierte Dispersion zeigte eine Vielzahl

unterschiedlicher Strukturen. Edwards et al. [1995] untersuchten wässrige Dispersionen von Natriumoleat und Ölsäure. Die gebildeten kolloidalen Strukturen waren außer von der Konzentration insbesondere vom pH-Wert abhängig. Bei pH-Werten oberhalb von 10, bei denen die Fettsäure nahezu vollständig ionisiert vorliegt, wurden lange, zylindrische Mizellen beobachtet (3,6 mM Ölsäure). Bei einem pH-Wert von ca. 9 kam es zur Bildung meist unilamellarer Vesikel, die mit weiter abnehmenden pH aggregierten. Bei einem pH-Wert von 8,8 wurden auch globuläre, emulsionstropfenartige Partikel beobachtet. Fadenförmige Strukturen, uni- und multilamellare Vesikel sowie auch Emulsionstropfen mit stark kontrastierter Grenzfläche wurden in der mit Natriumoleat stabilisierten Cholesterylmyristat-Dispersion detektiert und sollten auf den Stabilisator zurückzuführen sein. Der Einfluss des pH-Wertes wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die Anwesenheit anderer kolloidaler Strukturen neben den Emulsionspartikeln ist generell unerwünscht. Eine Solubilisierung von lipophilen Stoffen in Mizellen bzw. Vesikeln sowie eine Umverteilung über den Lagerungszeitraum und somit eine Veränderung beispielsweise der Freisetzung eingearbeiteter Arzneistoffe ist denkbar. Des Weiteren sind metabolische und – abhängig von den Eigenschaften der kolloidbildenden Moleküle – zytotoxische Wirkungen nicht auszuschließen. Kommerzielle parenterale Fettemulsionen (z.B. Intralipid) enthalten neben Emulsionspartikeln auch einen Anteil an Liposomen [Rotenberg et al. 1991, Férézou et al. 2001, Westesen und Wehler 1992], die den Metabolismus der Emulsionspartikel beeinflussen und einen verlangsamten Abbau der Fettpartikel hervorrufen können [Bach et al. 1996].

Einfluss des Stabilisatorsystems auf das Kristallisationsverhalten

Das Stabilisatorsystem beeinflusst ganz entscheidend das Phasenverhalten der Cholesterylmyristat-Nanopartikel. So unterschieden sich sowohl die Form als auch die Lage der flüssigkristallinen Phasenübergänge praktisch in allen Systemen mehr oder weniger deutlich voneinander (Abb. 4.4.39). Gewisse Ähnlichkeiten im Phasenverhalten zeigten die mit Poloxamer, Poloxamin und PVA sowie die mit Gelatinepolysuccinat und Natriumcaseinat stabilisierten Dispersionen.

Am größten war jedoch der Einfluss des Stabilisatorsystems auf das Kristallisationsverhalten der Nanopartikel. Anhand des Kristallisationsmusters sowie der Rekristallisationstendenz über den Lagerungszeitraum lassen sich die unterschiedlich stabilisierten Nanopartikel in zwei Gruppen einteilen (Abb. 4.4.40):

- Von der thermischen Vorbehandlung abhängiges, mehrgipfliges Kristallisationsgeschehen und hohe Rekristallisationstendenz über den Lagerungszeitraum.
- Von der thermischen Vorbehandlung unabhängiges, eingipfliges Kristallisationsgeschehen und geringe Rekristallisationstendenz über den Lagerungszeitraum.

Strukturelle Gemeinsamkeit der Stabilisatoren, die eine hohe Rekristallisationstendenz der smektischen Nanopartikel hervorrufen, sind Fettsäureketten in den Molekülen. Am stärksten war die Rekristallisation der Nanopartikel in der Dispersion, die mit dem Zuckerester (ca. 95% Saccharosemonolaurat) stabilisiert wurde, ausgeprägt. Allerdings wurde in dieser Dispersion auch ein deutliches Partikelgrößenwachstum über den Lagerungszeitraum beobachtet.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weisen auf unterschiedliche Partikelfractionen in Dispersionen hin, die auf der Basis von Soja-Phospholipiden sowie Natriumoleat stabilisiert wurden (sphärische und zylinderförmige Partikel, s.o.). Die mit dem Zuckerester stabilisierte Dispersion, für die aufgrund des ähnlichen Kristallisationsmusters

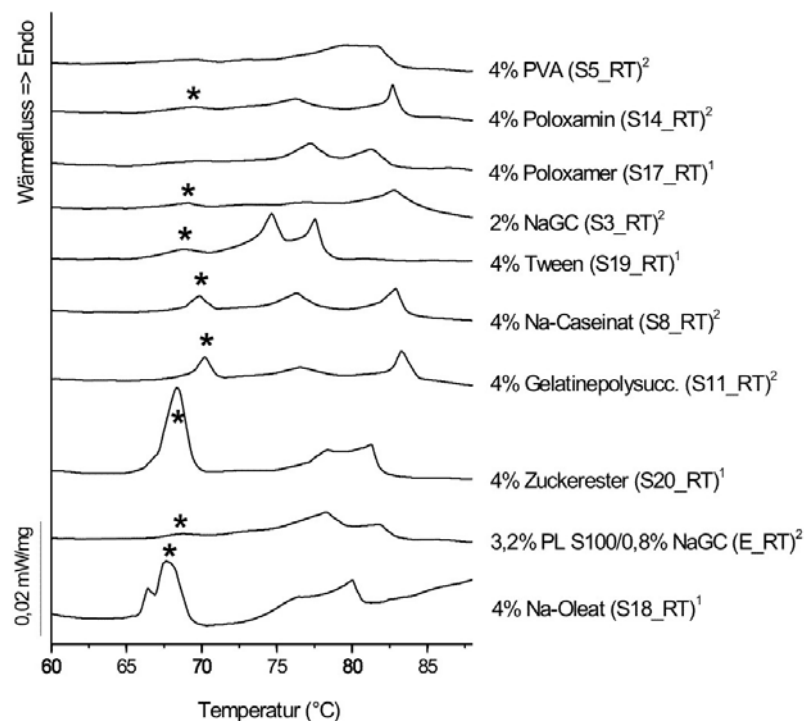


Abbildung 4.4.39: DSC-Heizkurven (5 °C/min, Messungen 5¹⁾ bzw. 6²⁾ Monate nach Herstellung) der thermisch unbehandelten Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren. Schmelzereignisse, die auf rekristallisiertes CM in den Dispersionen zurückzuführen sind, sind mit einem (*) gekennzeichnet.

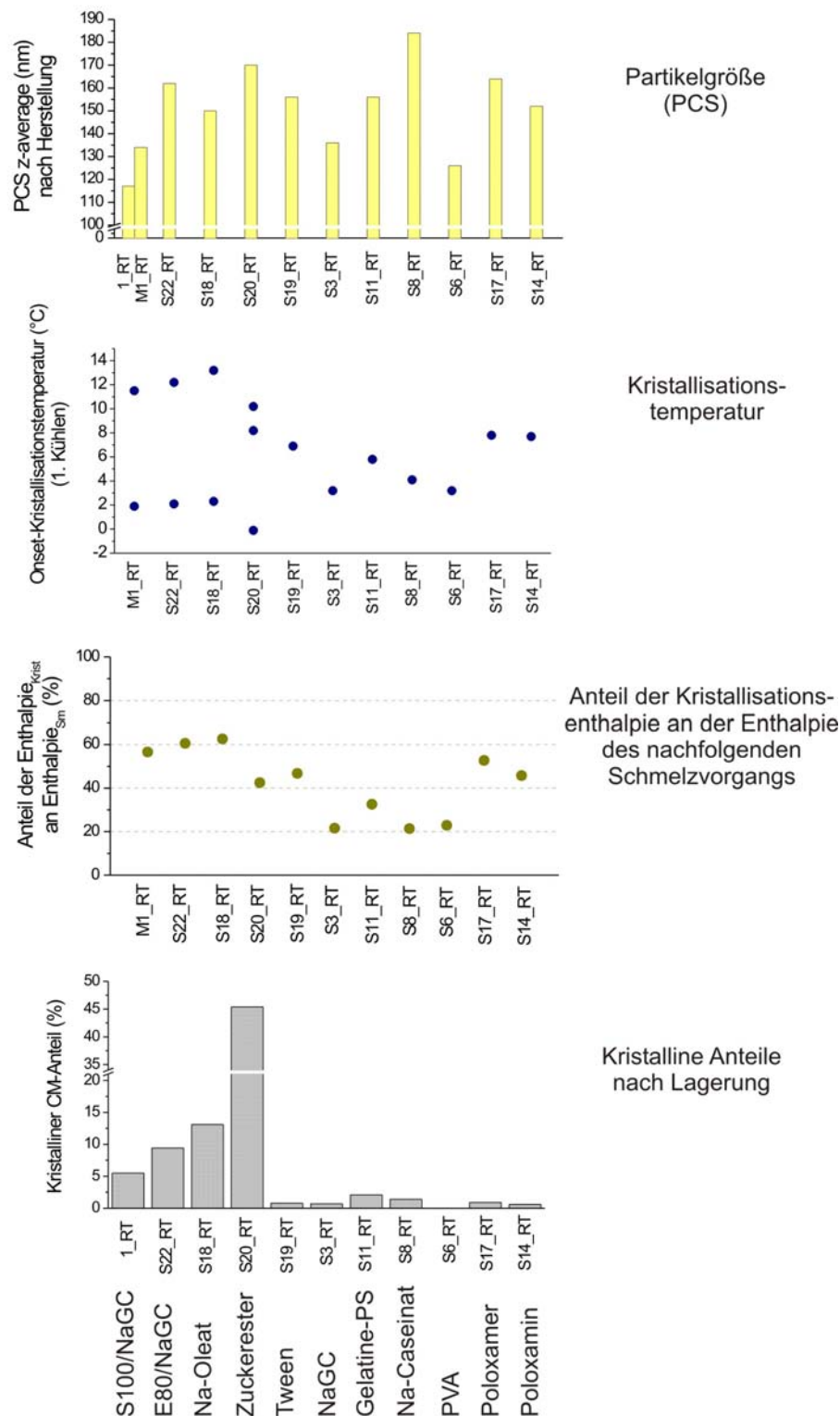


Abbildung 4.4.40: Partikelgröße (PCS) nach Herstellung; Onset-Kristallisationstemperatur der thermisch unbehandelten Dispersionen (5 °C/min) nach Herstellung bzw. 2 Monate nach Herstellung; Anteil der Kristallisationsenthalpie an der Schmelzenthalpie des nachfolgenden Heizvorgangs und rekristallisierte Cholesterylmyristat-Anteile nach 8- (S19_RT und 1_RT) bzw. 9monatiger Lagerung der Dispersionen bei 23 °C. Die mit dem Zuckerester stabilisierte Dispersion zeigte über den Lagerungszeitraum ein deutliches Partikelgrößenwachstum.

eine ähnliche Heterogenität der Cholesterylmyristat-Partikel angenommen werden kann, wurde elektronenmikroskopisch nicht untersucht. Es ist wahrscheinlich, dass das mehrgipflige Kristallisationsgeschehen sowie auch die beobachteten Unterschiede im Kristallisationsverhalten der thermisch unbehandelten und der vorher aufgeschmolzenen Proben durch unterschiedliche Partikelformen kolloidaler Cholesterylmyristat-Partikel bedingt sind. Aufschlüsse über das thermische Verhalten und die Umlagerungsgeschwindigkeit von sphärischen Partikeln in zylinderförmige könnten durch cryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Aufschmelzen der Nanopartikel gewonnen werden. So stellt sich insbesondere die Frage, ob im Falle einer ausreichend geringen Partikelgröße bei Bildung der smektischen Phase spontan zylinderförmige Partikel entstehen oder ob zunächst sphärische Partikel gebildet werden, die sich beim weiteren Abkühlen bzw. bei der Lagerung in zylinderförmige umlagern.

Im Unterschied zu den mit fettsäurehaltigen Emulgatoren stabilisierten Nanopartikeln zeigten die mit Polymeren sowie allein mit Natriumglycocholat hergestellten Dispersionen ein eingipfliges Kristallisationsverhalten, das nicht von der thermischen Behandlung abhängig war. Diese Dispersionen wiesen zudem trotz der relativ hohen Kristallisationstemperaturen eine deutlich geringere Rekristallisationstendenz auf (Abb. 4.4.40). Elektronenmikroskopisch erschienen diese Dispersionen homogener. Es gibt keinen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Fraktionen von Cholesterylmyristat-Partikeln mit unterschiedlicher Partikelgestalt. Die Partikel scheinen eine annähernd zylinder- bis pflastersteinartige, nicht-sphärische Gestalt aufzuweisen. In den Cryo-Präparationen wurden in den untersuchten polymerstabilisierten Dispersionen keine gegenüber dem Elektronenstrahl instabilen Partikel beobachtet.

Die mit Tween 80 stabilisierte Dispersion lässt sich keiner der beiden Gruppe zuordnen. Die Kristallisation war wie in den auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Dispersionen abhängig von der thermischen Vorbehandlung, die Rekristallisationstendenz der Nanopartikel über den Lagerungszeitraum war sehr gering. Die cryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen weisen auf eine einheitliche Partikelstruktur mit einer annähernd zylinderförmigen Gestalt hin.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss der Fettsäuren auf das Kristallisationsverhalten sowie die Partikelgestalt detaillierter zu klären. Interessant wäre beispielsweise, ob durch die Einarbeitung von Fettsäuren in die Cholesterolester-Matrix bei polymerstabilisierten Dispersionen die Bildung unterschiedlicher Partikelfraktionen sowie ein komplexes Kristallisationsmuster induziert werden kann. Untersuchungen an kolloidalen Dispersionen reiner Triglyceride haben gezeigt, dass die Verwendung eines aufgereinigten

hydrierten Soja-Phospholipids (Lipoid S100-3) bzw. synthetische Phosphatidylcholine mit gesättigten Fettsäureketten (wie beispielsweise Dipalmitoylphosphatidylcholin) die Kristallisationstemperatur der Nanopartikel deutlich erhöht im Vergleich zu Dispersionen, die mit aufgereinigtem Soja-Lecithin (Lipoid S100), das einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäureketten enthält, stabilisiert waren. Auch die Verwendung gereinigter Ei-Lecithine (E80 und E100), die im Vergleich zu Soja-Lecithinen einen höheren Anteil gesättigter Fettsäuren enthalten (s. Tab. 3.1.2), erhöhte die Kristallisationstemperatur von Tripalmitat-Nanopartikeln im Vergleich zu den Nanopartikeln, die mit gereinigten Soja-Lecithinen (S100 und S75)

stabilisiert wurden. Interessanterweise wurde auch eine Verlangsamung der polymorphen Umwandlung (Stabilisierung der metastabilen α -Modifikation) beobachtet [Bunjes und Koch 2005]. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die Stabilisierung der Cholesterylmyristat-Nanopartikel mit gereinigtem Ei-Lecithin (E80) zu einer Verschiebung des Hauptkristallisationsereignisses zu höheren Temperaturen im Vergleich zu Dispersionen, die mit gereinigten Soja-Lecithinen stabilisiert wurden (Abb. 4.4.41). Im Gegensatz dazu war das Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen jedoch kaum verändert.

Wie auch im Rohmaterial beobachtet wurde (Kapitel 4.1), waren die Kristallisationsenthalpien der Nanopartikel in allen Systemen deutlich geringer als die Enthalpie des nachfolgenden Schmelzvorganges (Abb. 4.4.40), wobei auch hier eine deutliche Abhängigkeit vom verwendeten Stabilisatorsystem beobachtet wurde. Auffällig waren die niedrigen Kristallisationsenthalpien in jenen Dispersionen, die zugleich eine niedrige Rekristallisationstendenz über den Lagerungszeitraum zeigten. Nur die mit Poloxamer und Poloxamin stabilisierten Dispersionen wiesen vergleichsweise hohe Kristallisationsenthalpien auf. Die Ursachen für die teilweise sehr niedrigen Kristallisationsenthalpien sind unklar. Sie könnten vielleicht auf eine nicht vollständige Kristallisation unter den gegebenen Bedingungen (Kühlrate 5 °C/min, Abkühlen auf -8 bis -13 °C) zurückgeführt werden. Es

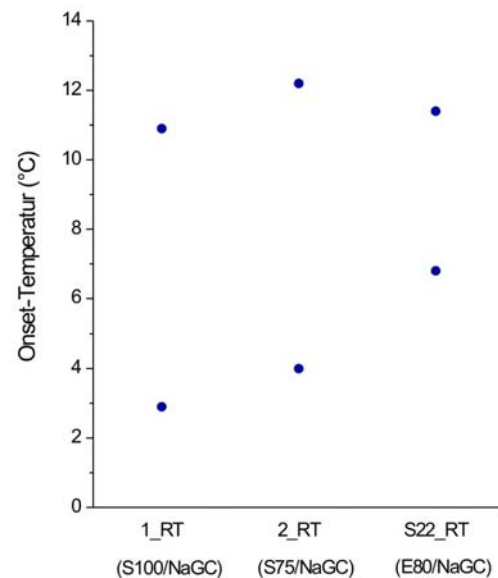


Abbildung 4.4.41: Onset-Temperaturen (DSC Kühlrate 5 °C/min) der Kristallisationsereignisse 5%iger Cholesterylmyristat-Nanopartikel in Abhängigkeit vom verwendeten Phospholipid (3.2% PL, 0.8% NaGC). Messung nach Herstellung der Dispersionen, Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Dispersionen.

muss aber auch die Möglichkeit der Ausbildung eines nicht-perfekten Kristallgitters in Betracht gezogen werden. Vor allem die mit Polyvinylalkohol, Natriumglycocholat, Gelatinepolysuccinat sowie Natriumcaseinat stabilisierten Nanopartikel zeigten eine sehr geringe Kristallisationsenthalpie bei einer Kühlrate von 5 °C/min. In der mit Polyvinylalkohol stabilisierten Dispersion wurde bei einer sehr niedrigen Heiz- bzw. Kühlrate (0,5 °C/min) beim Aufheizen nach dem Abkühlen auf -8 °C ein weiteres Kristallisationsereignis beobachtet. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten gefriergebrochene, mit Polyvinylalkohol stabilisierte smektische Nanopartikel eine deutlich stärkere innere Strukturierung als andere, beispielsweise mit Phospholipiden stabilisierte Nanopartikel. Insbesondere größere Partikel scheinen voneinander abgegrenzte Domänen des Matrixlipids aufzuweisen, worauf vielleicht die niedrige Rekristallisationstendenz dieser Partikel zurückgeführt werden kann.

In den meisten Dispersionen wurde über den Lagerungszeitraum eine unterschiedlich stark ausgeprägte Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergangstemperaturen beobachtet. In einigen Dispersionen wurde nach längerer Lagerung nur noch ein flüssigkristalliner Übergang beobachtet. Diese Beobachtungen lassen auf eine Veränderung in der Zusammensetzung der Matrix bzw. der Grenzschicht der Nanopartikel schließen. Die Lage der Röntgenkleinwinkelreflexe der smektischen Phase wurden durch das Stabilisatorsystem jedoch nicht beeinflusst (Tab. 4.4.2). Auch das Alter der Nanopartikel und somit eine möglicherweise veränderte Zusammensetzung der Lipidmatrix bzw. Grenzfläche scheint keinen Einfluss auf den Schichtabstand der smektischen Phase zu haben. Allerdings unterschieden sich die smektischen Reflexe der Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren recht deutlich in der Halbwertsbreite des Röntgenreflexes (Tab. 4.4.2). Interessanterweise zeigten die Dispersionen, die wahrscheinlich Cholesterylmyristat-Partikel mit unterschiedlicher Struktur enthalten (sphärische und zylinderförmige), größere mittlere Halbwertsbreiten von > 30 Detektorkanälen, mit Ausnahme der mit Ei-Phospholipid und Gallensalz stabilisierten Dispersion, für die eine Halbwertsbreite des smektischen Röntgenkleinwinkelreflexes von nur 24 Detektorkanälen bestimmt wurde. Der smektische Reflex war in den mit Polymeren stabilisierten Dispersionen deutlich schärfer (mittlere Halbwertsbreite < 25 Detektorkanäle). Die schärfsten smektischen Reflexe zeigten die mit Natriumglycocholat und Tween 80 stabilisierten Nanopartikel. Die mittlere Halbwertsbreite der Reflexe betrug hier jeweils 16 Detektorkanäle. Die Breite des smektischen Röntgenreflexes könnte jedoch auch von der Partikelgröße beeinflusst werden (zunehmende Reflexverbreiterung mit abnehmender Partikelgröße). Um den Effekt der unterschiedlichen

Stabilisatoren auf die Breite des smektischen Röntgenkleinwinkelreflexes eindeutig zu belegen, sollten Dispersionen mit möglichst gleicher mittlerer Partikelgröße und –verteilung verwendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der relativ hohen Kristallisationstemperaturen (bis zu 8 °C Onset-Temperatur) die mit Polymeren sowie allein mit Natriumglycocholat und Tween stabilisierten smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel nur eine sehr niedrige Rekristallisationstendenz aufwiesen. Der Anteil von rekristallisiertem Matrixlipid lag in diesen Dispersionen (mit den jeweils höchsten Stabilisatorkonzentrationen) nach einem Lagerungszeitraum von 8 bzw. 9 Monaten mit Ausnahme der mit Gelatinepolysuccinat stabilisierten Dispersion (2,1% kristallines Material) unter 1,5%. Im Unterschied dazu war die Rekristallisationstendenz in Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden, mit Natriumoleat oder dem Zuckertensid stabilisiert wurden, deutlich stärker ausgeprägt. Gemeinsames Merkmal dieser Stabilisatoren sind die Fettsäureketten in den Stabilisatormolekülen. Die Dispersionen zeigten in der DSC ein zwei- oder mehrgipfliges Kristallisationsgeschehen, das zudem von der thermischen Vorbehandlung abhängig war. Da zumindest für die mit Phospholipiden und auch mit Natriumoleat stabilisierten Systeme zwei Fraktionen von Emulsionspartikeln in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen wurden, scheint es naheliegend, dass die beobachteten Besonderheiten zumindest teilweise auf diese unterschiedlichen Partikelstrukturen (sphärische und zylinderförmige Partikel) zurückzuführen sind.

4.5 Einfluss der Matrixzusammensetzung auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten kolloidaler Cholesterolester-Partikel

Smektische Nanopartikel mit einer Matrix aus reinem Cholesterylmyristat sind sehr gute Modellsysteme für die Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Faktoren – wie beispielsweise Stabilisatorsystem und Partikelgröße – auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten der Nanopartikel. Aufgrund der Tatsache, dass smektische Cholesterylmyristat-Partikel in der Regel deutlich über 0 °C kristallisieren, sind sie als anwendbares Trägersystem für Arzneistoffe jedoch weniger geeignet. In Abhängigkeit von der Partikelgröße, dem Stabilisatorsystem sowie der Lagerungstemperatur kommt es über den Lagerungszeitraum zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Kristallisation der Nanopartikel. Für ein optimales Trägersystem sollten die smektischen Nanopartikel eine möglichst niedrige Kristallisationstemperatur aufweisen, so dass auch über einen längeren Lagerungszeitraum keine Rekristallisation der Partikel eintritt. Im Idealfall sollten die Partikel erst unter 0 °C kristallisieren, um eine Lagerung der Dispersionen auch im Kühlschrank zu ermöglichen, was insbesondere für Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden stabilisiert werden, hinsichtlich der chemischen Stabilität vorteilhaft wäre (s. Kapitel 4.8). Andererseits sollte der smektisch-isotrope Phasenübergang deutlich oberhalb von Körpertemperatur liegen, um den flüssigkristallinen Zustand der Partikel auch nach Applikation sicherzustellen.

Für die Herstellung der Nanopartikel mit alternativer Matrix wurden zwei längerkettige gesättigte Cholesterolester (Cholesterylmyristat und -palmitat), die im Bulk eine hohe Kristallisationstendenz aufweisen, sowie zwei Ester mit deutlich niedrigerer Kristallisationstendenz (das kürzerkettige Cholesterylnonanoat und das ungesättigte Cholesteryloleat) eingesetzt. Neben dem Phasenverhalten der reinen Ester wurde untersucht, ob durch die Zumischung der Ester mit geringerer Kristallisationstendenz zu Cholesterylmyristat bzw. -palmitat eine Abnahme der Kristallisationstendenz der Nanopartikel erzielt werden. Außerdem wurde untersucht, ob Cholesteryloleat und -nonanoat als alleinige Matrixlipide für die Herstellung stabiler smektischer Nanopartikel geeignet sind. Alle Dispersionen enthielten 5% Cholesterolester als Lipidmatrix sowie 3,2% Lipoid S100 und 0,8% Natriumglycocholat als Stabilisatoren und wurden mittels Schmelzhomogenisation mit dem Microfluidizer hergestellt. Die Zusammensetzung und die Homogenisationsbedingungen sind in Tabelle 4.5.1 angegeben.

Tabelle 4.5.1: Zusammensetzung, Herstellungsbedingungen und Partikelgröße nach Herstellung der Dispersionen unterschiedlicher Cholesterolester und Cholesterolestermischungen.

Dispersion	Matrix- Zusammensetzung CE	Matrix- Anteil (%)	Herstellungs- bedingungen	PCS d (nm)	PI	LD-PIDS D99
M1_RT	CM	100	p = 850-870 bar T = 85-90 °C 5 min	134	0,12	400
M2_RT	CN	100	p = 850 bar T = 85-90 °C 5 min	117	0,11	385
M3_RT	CP	100	p = 860 bar T = 85-90 °C 5 min	138	0,15	436
M4_RT	CO	100	p = 860 bar T = 65-75 °C 5 min	259	0,12	555
M5_RT	CM + CN	40 + 60	p = 860 bar T = 85-90 °C 5 min	122	0,12	383
M6_RT	CM + CN	80 + 20	p = 860-890 bar T = 85-90 °C 5 min	125	0,10	386
M7_RT	CM + CN	90 + 10	p = 860-890 bar T = 85-90 °C 5 min	127	0,09	376
M8_RT	CM + CO	80 + 20	p = 860-890 bar T = 85-90 °C 5 min	122	0,10	418
M9_RT	CP + CN	60 + 40	p = 860-890 bar T = 85-90 °C 5 min	120	0,07	395
M10_RT	CP + CN	50 + 50	p = 860-890 bar T = 85-90 °C 5 min	128	0,08	377
M11_RT	CP + CO	50 + 50	p = 860-890 bar T = 85-90 °C 5 min	139	0,04	390

4.5.1 Makroskopisches Aussehen und Partikelgröße nach Herstellung der Dispersionen

Nach der Herstellung erschienen alle Dispersionen homogen. Die mittlere Partikelgröße (PCS z-average) lag – mit Ausnahme der Cholesteryloleat-Dispersion, die eine deutlich höhere mittlere Partikelgröße aufwies – zwischen 115 und 140 nm (Tab. 4.5.1, Abb. 4.5.1). In den LD-PIDS-Messungen wurden zweipipflige Volumenverteilungen mit einem Hauptmaximum bei ca. 100 nm und einem zweiten, als Schulter erscheinendem Maximum bei ca. 300-350 nm erhalten (Abb. 4.5.1). Die Dispersion mit reiner Cholesteryloleat-Matrix, die im Gegensatz zu den anderen Dispersionen nach der Hochdruckhomogenisation nur durch einen 5 µm-Filter filtriert werden konnte, wies eine von den anderen Dispersionen abweichende Volumenverteilung (LD-PIDS) mit einem Hauptmaximum bei 358 nm auf (Abb. 4.5.1).

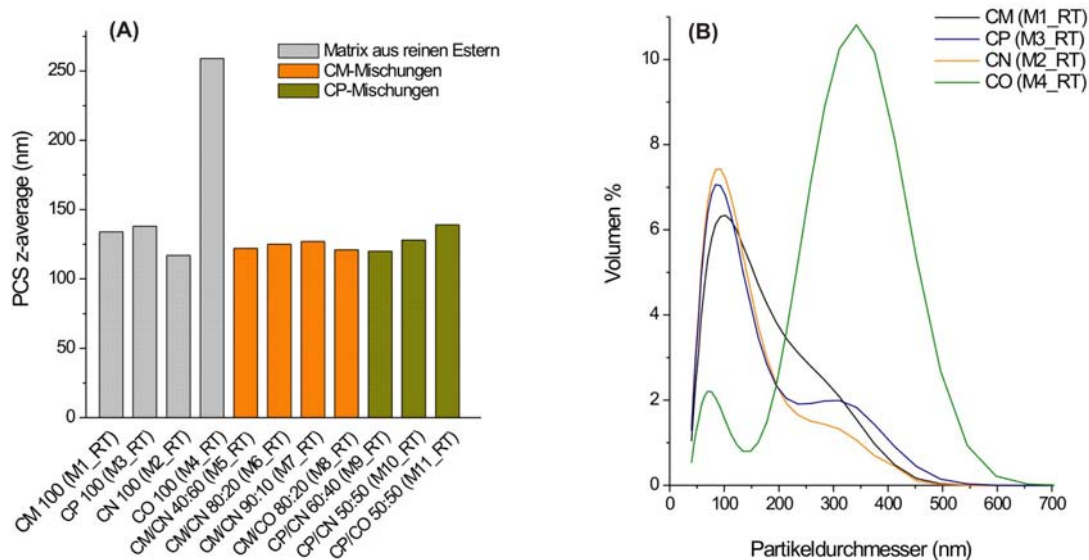


Abbildung 4.5.1: Partikelgröße nach Herstellung der Dispersionen: (A) PCS z-average. Die Polydispersitätsindices waren $\leq 0,15$ für alle Dispersionen. (B) LD-PIDS Volumenverteilung der Dispersionen der reinen Cholesteroler.

4.5.2 Phasenverhalten der Dispersionen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidmatrix

Nanopartikel aus den reinen Cholesterolestern

Das Phasenverhalten von Cholesterylmyristat-Nanopartikeln ist in den Kapiteln 4.2 und 4.4 ausführlich dargestellt und soll aus diesem Grund hier nicht näher beschrieben werden. Zum Vergleich mit den anderen Systemen sind die Nanopartikel mit reiner Cholesterylmyristat-Matrix in den Graphiken mit aufgeführt.

Die smektische Phase der Cholesterylpalmitat-Nanopartikel wurde nur im Kühlprozess beobachtet. Im Unterschied zum Rohmaterial (Kapitel 4.1) wurde beim Aufheizen der kristallisierten Nanopartikel neben dem Schmelzpeak ein weiterer Phasenübergang beobachtet, wobei es sich um den cholesterisch-isotropen Phasenübergang handeln könnte. Beide Phasenübergänge waren nicht voneinander getrennt (Abb. 4.5.2). Die Kristallisation der Cholesterylpalmitat-Nanopartikel setzte schon nahe Raumtemperatur ein, so dass am Tag nach Herstellung der Dispersionen ein großer Teil der Partikel (ca. 35%) im kristallinen Zustand vorlag. Wie bei den Cholesterylmyristat-Dispersionen wurde auch bei den kolloidalen Cholesterylpalmitat-Partikeln ein zweigipfliges Kristallisationsgeschehen beobachtet (Abb. 4.5.2).

Kolloidale Cholesterylnonanoat-Partikel kristallisierten auch bei 18monatiger Lagerung im Kühlschrank (4 °C) nicht. In den DSC-Untersuchungen wurde bei Kühlraten von 0,5 und 5 °C/min keine Kristallisation beim Abkühlen auf -8 bzw. -10 °C beobachtet. Die flüssigkristallinen Phasenübergänge – insbesondere der smektisch-cholesterische Übergang – waren auch in der Micro-DSC (Scanrate 0,5 °C/min) sehr breit und klein (Abb. 4.5.2) und konnten in dem Pyris 1-DSC-Gerät (Scanrate 5 °C/min) nicht detektiert werden.

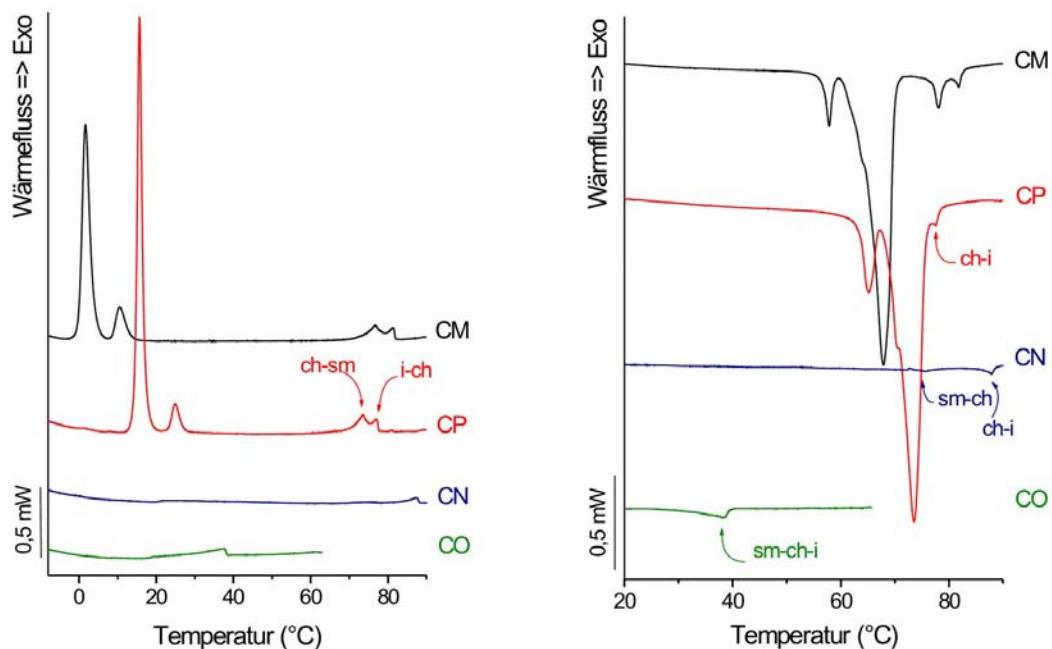


Abbildung 4.5.2: DSC Kühl- und Heizkurven (Scanrate 0,5 °C/min, Messung nach Herstellung der Dispersionen) der Nanopartikel mit unterschiedlicher Matrix. Die Dispersionen wurden auf 60 bzw. 90 °C aufgeheizt (nicht gezeigt), auf -10 °C abgekühlt (links) und anschließend wieder auf 60 bzw. 90 °C aufgeheizt (rechts). In den Graphiken ist der smektisch-cholesterische Übergang der CN-Nanopartikel schlecht zu erkennen, da er sehr breit und flach ist.

Auch Cholesteryl-oleat-Nanopartikel zeigten in den DSC-Messungen kein Kristallisationsereignis. Die flüssigkristallinen Phasenübergänge waren sehr klein und breit und konnten nur in der Micro-DSC (0,5 °C/min) detektiert werden. Im Gegensatz zum Rohmaterial wurden zwei flüssigkristalline Übergänge (smektisch-cholesterisch und cholesterisch-isotrop) beobachtet, die jedoch nicht voneinander getrennt waren. Der smektisch-cholesterische Übergang erschien als sehr breite, flache Schulter.

Nanopartikel mit gemischter Matrix

Der Zusatz von Cholesterylnonanoat sowie -oleat zu Cholesterylmyristat führte zu einer Verringerung der Kristallisationstemperatur (Abb. 4.5.3). Nanopartikel mit einem hohen Gehalt an Cholesterylnonanoat in der Lipidmatrix (CM/CN 40+60) kristallisierten auch bei Lagerung im Kühlschrank (18 Monate) sowie beim Abkühlen in der DSC auf -10 °C auch bei sehr geringer Kühlrate nicht. Allerdings waren bei diesem hohen Anteil an Cholesterylnonanoat die flüssigkristallinen Phasenübergänge sehr klein und flach, insbesondere der smektisch-cholesterische Übergang. Mit abnehmender Cholesterylnonanoat-Konzentration wurden die flüssigkristallinen Phasenübergänge schärfer und damit besser quantifizierbar (Abb. 4.5.3). Bei Lagerung im Kühlschrank kam es in beiden Dispersionen mit geringeren Cholesterylnonanoat-Konzentration (CM/CN 80+20 bzw. 90+10) zu einer

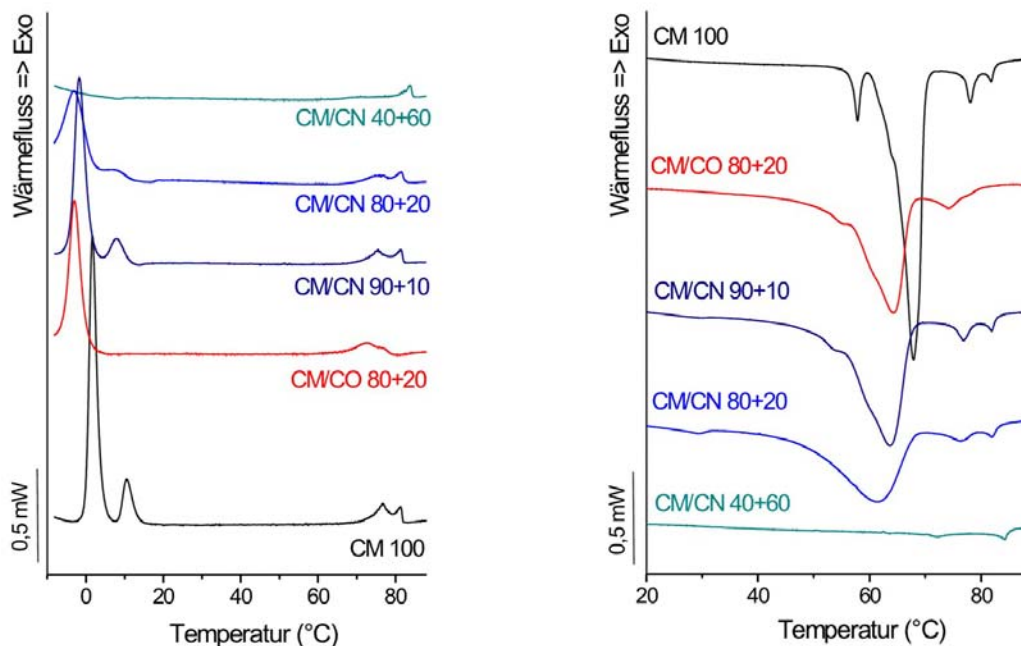


Abbildung 4.5.3: DSC Kühl- und Heizkurven (Scanrate 0,5 °C/min, Messung nach Herstellung der Dispersionen) der Nanopartikel mit gemischter Matrix im Vergleich zu Nanopartikeln mit reiner Cholesterylmyristat-Matrix. Die Dispersionen wurden auf 90 °C aufgeheizt (nicht gezeigt), auf -8 bzw. -10 abgekühlt (links) und anschließend wieder auf 90 °C aufgeheizt (rechts).

Tabelle 4.5.2: Kristallisationstemperaturen der vorher aufgeschmolzenen Nanopartikel (DSC, Scanrate 0,5 °C/min, Messung nach Herstellung der Dispersionen).

Dispersion	Zusammensetzung	Onset-Kristallisationstemperatur (°C)	
		Peak 1	Peak 2
M1_RT	CM 100%	13,4	3,6
M7_RT	CM/CN 90+10%	11,0	1,2
M6_RT	CM/CN 80+20%	11,0	1,4
M8_RT	CM/CO 80+20%		-0,1

Kristallisation der Nanopartikel. In diesen beiden Dispersionen wurde ein zweigipfliges Kristallisationsgeschehen beobachtet. Die Fläche unter dem Peak bei höheren Temperaturen nahm mit abnehmender Cholesterylnonanoat-Konzentration zu (4,4% vs. 9,4% in der Dispersion mit einer Matrix von CM/CN 80+20 bzw. 90+10). Die Kristallisationstemperaturen waren im Vergleich zu reinen Cholesterylmyristat-Nanopartikeln zu tieferen Temperaturen verschoben, wobei kein deutlicher Unterschied zwischen der Dispersion mit 10 bzw. 20% Cholesterylnonanoat gefunden wurden (Tab. 4.5.2).

Nanopartikel mit einer gemischten Cholesterylmyristat-/oleat-Matrix (CM/CO 80+20) zeigten beim Abkühlen der aufgeschmolzenen Dispersion in der DSC nur ein Kristallisationsereignis mit einer Onset-Temperatur von -0,1 °C (Abb. 4.5.3, Tab. 4.5.2). Die flüssigkristallinen Übergänge waren leicht zu niedrigeren Temperaturen verschoben und nicht voneinander getrennt (Abb. 4.5.3), jedoch relativ reproduzierbar zu quantifizieren. Bei der Kristallisation der thermisch unbehandelten Originaldispersion (1. Kühlen) wurde auch in dieser Dispersion ein zweigipfliges Kristallisationsgeschehen beobachtet (Onset 10,4 °C und -0,9 °C, Kühlrate 0,5 °C/min).

Aufgrund der hohen Kristallisationstemperatur der Cholesterylpalmitat-Partikel wurden Cholesterylnonanoat und -oleat in höheren Konzentrationen eingesetzt (Tab. 4.5.1). Die Nanopartikel mit gemischter Matrix zeigten eine deutlich verringerte

Tabelle 4.5.3: Kristallisationstemperaturen der vorher aufgeschmolzenen Nanopartikel (DSC, Scanrate 0,5 °C/min, Messung nach Herstellung der Dispersionen).

Dispersion	Zusammensetzung	Onset-Kristallisationstemperatur (°C)	
		Peak 1	Peak 2
M3_RT	CP 100%	27,0	16,1
M9_RT	CP/CN 60+40%		8,6
M10_RT	CP/CN 50+50%		6,0
M11_RT	CP/CO 50+50%		4,6

Kristallisationstemperatur. In allen untersuchten Mischungen wurde nur ein relativ breites Kristallisationsereignis beobachtet (Tab. 4.5.3).

In allen Dispersionen mit gemischter Matrix kam es zu einer starken Verbreiterung der flüssigkristallinen Phasenübergänge (Abb. 4.5.4). Insbesondere der smektisch-cholesterische Phasenübergang war sehr flach und schlecht quantifizierbar. In der Cholesterylpalmitat-/oleat-Mischung wurde im Kühlprozess nur ein flüssigkristalliner Phasenübergang beobachtet, der zu deutlich niedrigeren Temperaturen verschoben war. Beim Aufheizen der vorher kristallisierten Nanopartikel wurde in dieser Dispersion kein flüssigkristalliner Übergang beobachtet, da die entsprechende Phasenübergangstemperatur unterhalb der des sehr breiten Schmelzereignisses lag. In den Dispersionen mit einer gemischten Cholesterylpalmitat-/nonanoat-Matrix wurden beim Aufheizen der vorher kristallisierten Nanopartikel zwei sehr breite Schmelzereignisse beobachtet (Abb. 4.5.4), was auf ein eutektisches Verhalten hinweist. Das Schmelzen der Nanopartikel setzte schon bei sehr niedrigen Temperaturen (unterhalb von Körpertemperatur) ein.

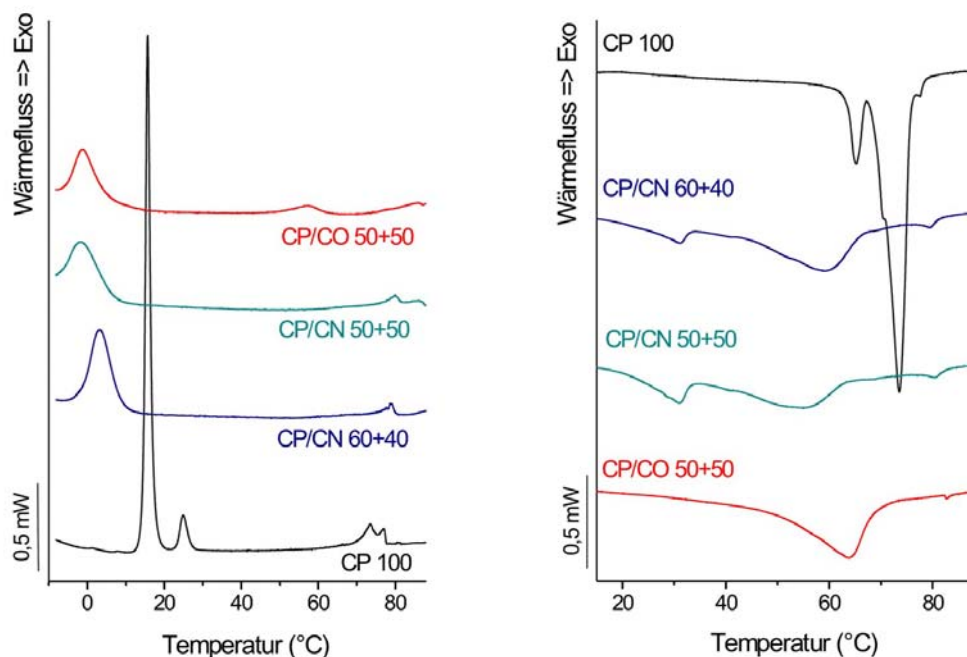


Abbildung 4.5.4: DSC Kühl- und Heizkurven (Scanrate 0,5 °C/min, Messung nach Herstellung der Dispersionen) der Nanopartikel mit gemischter Matrix im Vergleich zu Nanopartikeln mit reiner Cholesterylpalmitat-Matrix. Die Dispersionen wurden auf 90 °C aufgeheizt (nicht gezeigt), auf -8 bzw. -10 °C abgekühlt (links) und anschließend wieder auf 90 °C aufgeheizt (rechts).

4.5.3 Abhängigkeit der Röntgenkleinwinkelreflexe von der Matrix-Zusammensetzung

Aufgrund der sehr kleinen und flachen flüssigkristallinen Phasenübergänge der Dispersionen mit gemischter Matrix kann der smektische Zustand der Partikel nur mit Hilfe des für die smektische Phase charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflexes eindeutig nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Moleküllängen der verwendeten Cholesterolester spiegeln sich in unterschiedlichen Lagen des smektischen Reflexes wieder (Tab. 4.5.4). Alle bei 23 °C gelagerten Dispersionen zeigten nach 7monatiger Lagerung den für die smektische Phase charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflex. In der Cholesterylpalmitat-Dispersion war der smektische Reflex aufgrund des hohen Anteils kristalliner Partikel nur von geringer Intensität. In dieser Dispersion wurden auch die Reflexe der kristallinen Phase beobachtet.

Dispersionen der reinen Cholesterolester

Das kürzerkettige Cholesterylnonanoat wies einen deutlich kleineren Schichtabstand der smektischen Phase (28,4 Å, 20 °C) im Vergleich zu den längerkettigen auf (ca. 35,1 Å für Cholesterylmyristat und ca. 37,9 Å für Cholesterylpalmitat, 20 °C, Abb. 4.5.5). Aufgrund der ungesättigten Fettsäurekette zeigt die smektische Phase von Cholesteryloleat einen geringeren Schichtabstand (36,4 Å bei 20 °C) als man es für den gesättigten Ester erwarten würde. So ist in der Literatur für Cholesterylstearat, dem gesättigten Ester mit einer C₁₈-Fettsäurekette, ein

Tabelle 4.5.4: Röntgenkleinwinkelreflexe der bei 23 °C und 4 °C gelagerten Dispersionen bei 20 °C (Messung 7 und 24 Monate nach Herstellung der Dispersionen). Für die kristallinen Nanopartikel ist jeweils der Reflex 1. Ordnung in Fettdruck angegeben.

Dispersion	Zusammensetzung	Schichtabstand (Å)			
		Lagerung bei 23 °C		Lagerung bei 4 °C	
		(RT)	(KS)		
		7 M.n.H.	24 M.n.H.	7 M.n.H.	24 M.n.H.
<i>Matrix der reinen Cholesterolester</i>					
M1_RT/KS	CM 100%	35,1	35,1	50,9	50,6
M3_RT/KS	CP 100%	37,9 ¹⁾	53,5²⁾	53,2	53,0
M2_RT/KS	CN 100%	28,4	28,5	28,5 ³⁾	28,4 ³⁾
M4_RT/KS	CO 100%	36,4	kein Reflex	36,4 ³⁾	36,5
<i>Gemischte Matrix</i>					
M5_RT/KS	CM/CN 40+60%	31,0	31,0	31,0 ³⁾	31,0 ³⁾
M6_RT/KS	CM/CN 80+20%	34,5	33,9	50,9⁴⁾	50,1⁴⁾
M7_RT/KS	CM/CN 90+10%	34,5	34,5	50,7⁴⁾	50,3
M8_RT/KS	CM/CO 80+20%	35,3	35,2	50,7⁴⁾	50,3⁴⁾
M9_RT/KS	CP/CN 60+40%	33,9	34,1	50,7⁴⁾	50,3⁴⁾
M10_RT/KS	CP/CN 50+50%	32,7	32,9	50,2⁴⁾	49,6⁴⁾
M11_RT/KS	CP/CO 50+50%	37,5	37,7	51,7⁴⁾	51,9⁴⁾

¹⁾ auch kristalline Reflexe

²⁾ kein smektischer Reflex

³⁾ keine kristallinen Reflexe

⁴⁾ auch smektischer Reflex

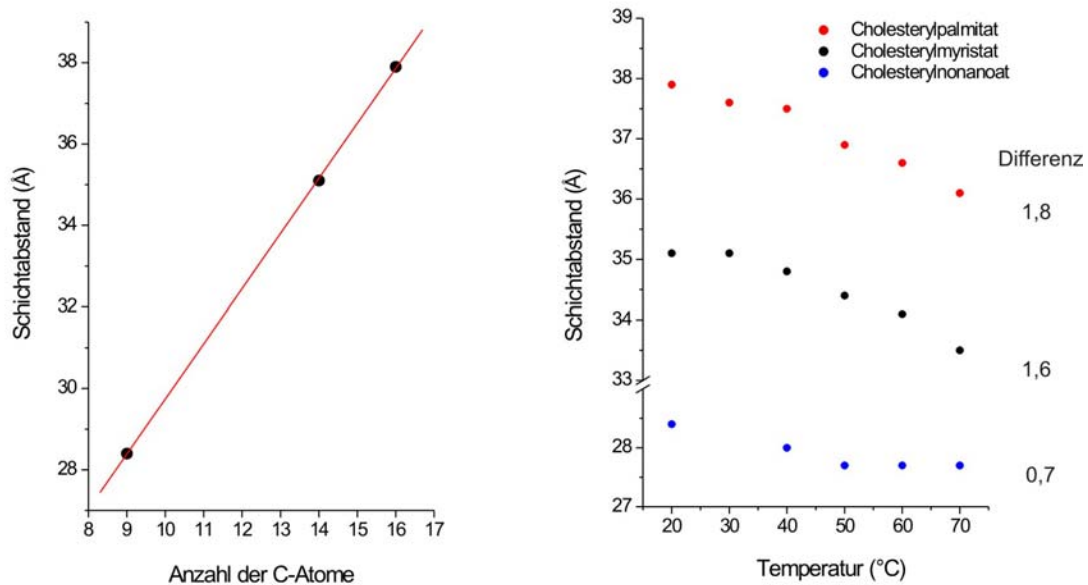


Abbildung 4.5.5: Abhängigkeit der Schichtabstände der smektischen Phase der Nanopartikel mit einer Matrix gesättigter Cholesterolester von der Anzahl der C-Atome der Fettsäurekette (links) und Veränderung der smektischen Schichtabstände mit der Temperatur (rechts, Messung im Kühlprozess).

Schichtabstand für die smektische Phase von 37,5 Å angegeben [Ginsburg et al. 1984]. Für Cholesteryloleat wird des Weiteren eine smektische C-Phase angenommen, in der die Moleküle in Bezug auf die smektischen Schichten gekippt angeordnet sind [Ginsburg et al. 1984].

Die smektischen Reflexe verschoben sich mit sinkender Temperatur zu kleineren Winkeln (zunehmender Schichtabstand der smektischen Phase mit abnehmender Temperatur, Abb. 4.5.5). Das Ausmaß der Reflexverschiebung war bei den einzelnen Cholesterolestern unterschiedlich stark ausgeprägt und nahm mit zunehmender Kettenlänge zu (Abb. 4.5.5).

Dispersionen mit gemischter Matrix

Durch den Zusatz von Cholesteryloleat bzw. -nonanoat zu Cholesterylmyristat bzw. -palmitat kam es zu einer Verschiebung der Röntgenkleinwinkelreflexe (Abb. 4.5.6). Die Schichtabstände der kristallinen Phase wurden im Vergleich zu denen der smektischen Phase in einem geringeren Ausmaß beeinflusst (Abb. 4.5.6). In fast allen Dispersionen mit gemischter Matrix wurde auch nach längerer Lagerung bei 4 °C der Reflex der smektischen Phase beobachtet. Nur in der Dispersion mit der geringsten Cholesterylnonanoat-Konzentration (CM/CN 90+10) war dieser Reflex nach 24monatiger Lagerung im Kühlschrank nicht mehr nachweisbar (Tab. 4.5.4).

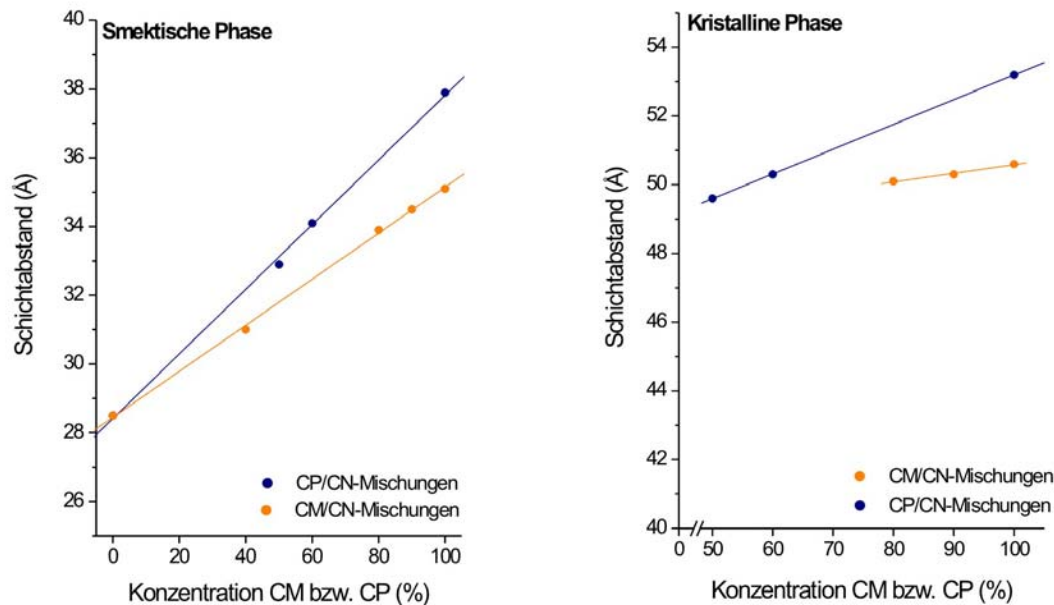


Abbildung 4.5.6: Einfluss der Schichtabstände der smektischen (links) sowie kristallinen Phase (rechts) der Nanopartikel mit gemischter Matrix in Abhängigkeit von der Cholesterylnonanoat-Konzentration. Messung 24 Monate nach Herstellung der Dispersionen mit Ausnahme der Dispersion mit reiner Cholesterylpalmitat-Matrix, für die das Ergebnis der Messung nach 7monatiger Lagerung angegeben ist.

4.5.4 Ultrastruktur

Zur Beurteilung der Struktur der Nanopartikel wurden ausgewählte Dispersionen mit gemischter Matrix und auch die Cholesterylnonanoat-Dispersion im Elektronenmikroskop untersucht (Abb. 4.5.7).

Die Dispersionen zeigten keine deutlichen Unterschiede zum Erscheinungsbild gefriergebrochener, auf der Basis von Phospholipid S100 und Natriumglycocholat stabilisierter Cholesterylmyristat-Dispersionen. Die Emulsionspartikel erscheinen als runde oder eckige, strukturierte Formen neben einer Vielzahl runder Strukturen mit glatter Oberfläche (Liposomen). Vereinzelt wurden auch runde Partikel mit einer Zwiebschalenstruktur beobachtet, was auf das Vorliegen einer sphärischen Partikelfraktion hinweist.

4.5.5 Lagerstabilität der Dispersionen

Makroskopisches Aussehen und Partikelgröße

Alle untersuchten Dispersionen waren über den Lagerungszeitraum von 18 Monaten hinsichtlich makroskopischen Aussehens und Partikelgröße stabil (Abb. 4.5.8). Lediglich in

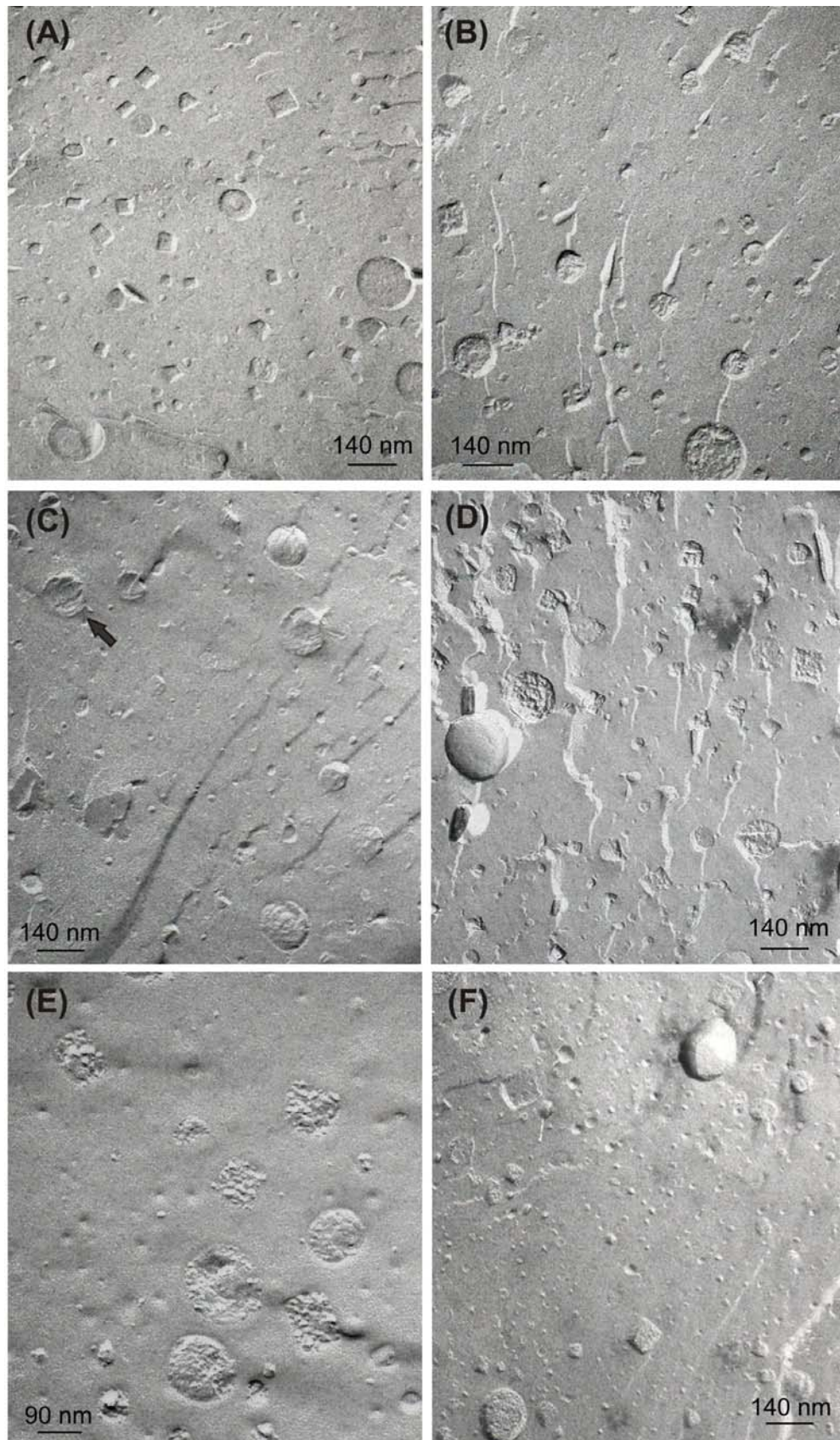


Abbildung 4.5.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen gefriergebrochener Replika. (A) und (B): M2_RT (5% CN). (C): M6_RT (4% CM, 1% CN). (D): M8_RT (4% CM, 1% CO). (E): M9_RT (3% CP, 2% CN) und (F): M11_RT (2,5% CP, 2,5% CO). Ein Partikel mit Zwiebelschalenstruktur ist in (C) mit einem Pfeil gekennzeichnet.

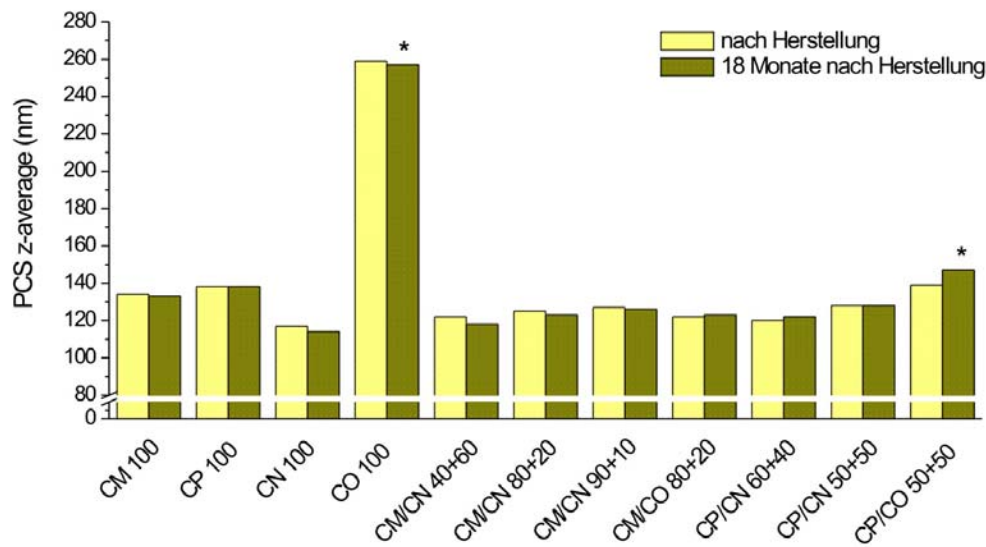


Abbildung 4.5.8: Partikelgröße (PCS) nach Herstellung und nach 18monatiger Lagerung. Die Polydispersitätsindices waren $< 0,15$ für alle Dispersionen nach Herstellung und Lagerung. In den mit einem Sternchen gekennzeichneten Dispersionen kam es in den LD-PIDS-Messungen zu einer geringfügigen Zunahme der Partikelgröße (nach Herstellung vs. nach Lagerung):

M4_RT (CO 100%): Mean 288 vs. 290 nm, Median 307 vs. 314 nm, Mode 358 vs. 393 nm;

M11_RT (CP/CO 50+50%): Mean 131 vs. 141 nm, Median 108 vs. 113 nm, Mode 97 vs. 97 nm.

der Dispersion mit der Cholesterylpalmitat-/oleat-Matrix (M11_RT) wurde eine geringfügige Zunahme der Partikelgröße über den Lagerungszeitraum von 18 Monaten beobachtet. In der Cholesteryl-oleat-Dispersion (M4_RT) kam es über den Lagerungszeitraum zu einer leichten Aufrahmung. Nach manuellem Schütteln erschien die Dispersion wieder homogen. Alle Dispersionen wiesen eine leichte Gelbfärbung auf.

Smektischer Zustand der Partikel

In keiner der bei 23 °C gelagerten Dispersionen mit gemischter Matrix kam es über den Beobachtungszeitraum von 18 Monaten zu einer Rekristallisation der Partikel. Da der flüssigkristalline Übergang der Dispersion mit der Cholesterylpalmitat-/oleat-Matrix (M11_RT) von dem Schmelzpeak überlagert ist, können sehr geringe Mengen rekristallisierten Materials in dieser Dispersion allerdings nicht eindeutig identifiziert werden. Das Vorliegen von kristallinem Material in den Dispersionen kann jedoch ausgeschlossen werden, da sich die Enthalpie des Übergangs im 1. Heizvorgang (Aufschmelzen der Originalprobe) über den Lagerungszeitraum nicht veränderte (0,143 J/g nach Herstellung und 0,144 J/g nach 18monatiger Lagerung).

Im Unterschied dazu wurde in den Dispersionen mit einer Matrix aus den reinen gesättigten, länger-kettigen Cholesterolestern rekristallisierte Anteile detektiert. Vor allem Cholesteryl-

palmitat-Nanopartikel zeigten eine ausgeprägte Rekristallisationstendenz. Nach 18monatiger Lagerung lag der überwiegende Teil der Partikel (94%) im kristallinen Zustand vor. In der Cholesterylmyristat-Dispersion wurde nach 18monatiger Lagerung ein kristalliner Anteil von ca. 8% ermittelt.

Für die reinen Cholesteryloleat-Nanopartikel, die bei 23 °C gelagert wurden, konnte der smektische Zustand nach 24monatiger Lagerung nicht mehr nachgewiesen werden. In der Röntgenuntersuchung gab die Dispersion nicht den für die smektische Phase charakteristischen Reflex, und auch in der DSC-Untersuchung wurden keine flüssigkristallinen Phasenübergänge detektiert. Der bei 4 °C gelagerte Teil der Dispersion zeigte nach Lagerung sowohl den charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflex der smektischen Phase als auch einen flüssigkristallinen Phasenübergang in der DSC-Untersuchung.

4.5.6 Zusammenfassung und Diskussion

Nanopartikel mit einer Matrix von längerkettigen gesättigten Cholesterolestern wie Cholesterylmyristat und insbesondere Cholesterylpalmitat weisen eine relativ hohe Rekristallisationstendenz auf, so dass diese Ester als Matrixlipide für die Herstellung eines robusten Trägersystems für Arzneistoffe basierend auf smektischen Nanopartikeln auch in optimierten Systemen (geringe Partikelgröße, geeigneter Stabilisator) weniger geeignet sind. Im Gegensatz dazu kristallisierten kolloidale Cholesterylnonanoat- und -oleat-Partikel auch bei Lagerung im Kühlschrank (4 °C) nicht. Bei Cholesteryloleat-Nanopartikeln liegen die flüssigkristallinen Phasenübergangstemperaturen ähnlich wie bei LDL nahe Körpertemperatur [Deckelbaum et al. 1977, Kroon 1981], so dass der smektische Zustand bei diesen Temperaturen nicht erhalten bleibt. Weiterhin konnte nach längerer Lagerung bei 23 °C der smektische Zustand der Cholesteryloleat-Partikel nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erscheint Cholesterylnonanoat vielversprechend für die Herstellung smektischer Nanopartikel mit einer hohen Stabilität gegenüber Rekristallisation. Da dieser Ester jedoch eine nicht-physiologische ungradzahlige Fettsäurekette enthält, bleiben insbesondere im Hinblick auf eine parenterale Applikation toxikologische Fragestellungen zu klären.

Durch den Zusatz der Cholesterolster mit niedriger Kristallisationstendenz zu Cholesterylmyristat- bzw. -palmitat können smektische Nanopartikel hergestellt werden, deren flüssigkristalline Phasenübergänge bei hohen Temperaturen liegen, die jedoch auch bei längerer Lagerung bei 23 °C nicht rekristallisieren. Wurden die Systeme bei 4 °C gelagert, kam es mit Ausnahme der Dispersion mit einer gemischten Cholesterylmyristat-/nonanoat-

Matrix 40+60 zur Kristallisation eines Teils der Nanopartikel. Mit einer Ausnahme (CM/CN 90+10) wurde in allen Dispersionen mit gemischter Matrix auch noch nach 24monatiger Lagerung der smektische Reflex beobachtet.

In der Literatur sind Phasendiagramme unterschiedlicher Cholesterolestermischungen [Small 1986, Galanti und Porter 1972, Dorset 1987], unter anderem von Cholesterylmyristat/-nonanoat [Small 1986] und Cholesterylpalmitat/-oleat [Small 1986, Snow et al. 1988, Snow und Philips 1990] beschrieben. Demnach sind die smektischen Phasen verschiedener Cholesterolester – sowie auch die cholesterischen und isotropen Phasen – in allen Verhältnissen miteinander mischbar. In der Regel wird eutektisches Verhalten mit Koexistenz smektischer und kristalliner Phasen beobachtet. Der eutektische Punkt für Cholesterylmyristat/-nonanoat-Mischungen liegt bei 37 Mol% Cholesterylnonanoat und die feste Mischung der Ester schmilzt bei ca. 53 °C unter Bildung der smektischen Phase [Small 1986]. Die hohe Stabilität der Nanopartikel mit gemischter Cholesterylmyristat/-nonanoat-Matrix 40:60 % m/m (entspricht ca. 41 Mol% CM) gegenüber Rekristallisation lässt sich vielleicht auf das Vorliegen des Eutektikums zurückführen. Bei allen anderen Konzentrationsverhältnissen liegen bei Temperaturen oberhalb des Schmelzens der kristallinen Mischphase die smektische Phase und eine kristalline Phase in Koexistenz vor. Der eutektische Punkt für Cholesterylpalmitat/-oleat-Mischungen liegt bei ca. 83-84% (m/m) Cholesteryloleat und 49-50 °C [Snow et al. 1988, Snow und Philips 1990].

In den DSC-Untersuchungen zeigten alle Dispersionen mit gemischter Cholesterolester-Matrix ein sehr breites Schmelzereignis. In den Dispersionen mit Mischungen von Cholesterylpalmitat und -nonanoat wurden deutlich zwei Schmelzereignisse beobachtet, was auf ein eutektisches Verhalten hinweist. Das eutektische Verhalten war nicht so deutlich in den Cholesterylmyristat/-nonanoat-Mischungen mit geringen Cholesterylnonanoat-Anteilen (CM/CN 90:10 und CM/CN 80:20) ausgeprägt, was jedoch auch auf die geringeren Mengen Cholesterylnonanoat zurückgeführt werden kann.

Die Röntgenkleinwinkelreflexe der Nanopartikel mit einer Matrix der reinen Cholesterolester unterscheiden sich nicht deutlich von denen der entsprechenden Rohmaterialien (Tab. 4.5.5). Die unterschiedlichen Moleküllängen der verwendeten Ester spiegeln sich in den veränderten Schichtabständen der smektischen Phase wider. Für die gesättigten Cholesterolester nahm der Schichtabstand der smektischen Phase je –CH₂-Gruppe der Fettsäurekette um ca. 1,5 Å zu. Aufgrund der deutlich stärkeren Unterkühlungstendenz der smektischen Phase im kolloidalen Zustand kann die Abhängigkeit der Lage des smektischen Reflexes von der Temperatur über

Tabelle 4.5.5: Röntgenkleinwinkelreflexe der Nanopartikel im Vergleich zu denen der Rohmaterialien (Messung 7 Monate nach Herstellung der Dispersionen). Die Reflexlagen der smektischen Phase wurden im Kühlprozess ermittelt.

	Schichtabstand d (Å)			
	Kristalline Phase		Smektische Phase	
	Rohmaterial	Dispersion	Rohmaterial	Dispersion
CM	50,7	50,9	33,8 (70 °C)	33,5 (70 °C)
CP	53,4	53,2	36,1 (70 °C)	36,1 (70 °C)
CN	14,5	¹⁾	27,8 (60 °C)	27,7 (60 °C)
CO	18,6	¹⁾	36,0 (30 °C)	36,2 (30 °C)

¹⁾ Keine kristallinen Reflexe.

einen größeren Temperaturbereich untersucht werden. Erwartungsgemäß wurde für alle Cholesterolester eine Zunahme des smektischen Schichtabstandes mit abnehmender Temperatur beobachtet (s.a. Kapitel 4.1), wobei mit zunehmender Moleküllänge das Ausmaß der Reflexverschiebung zunahm, was wahrscheinlich auf eine stärkere Interpenetration längerer Fettsäureketten bei höheren Temperaturen zurückgeführt werden kann. In einer temperaturabhängigen röntgendiffraktometrischen Untersuchung wurde für Cholesterylnonanoat eine im Vergleich zu Cholesterylmyristat geringfügigere Zunahme des smektischen Schichtabstandes mit abnehmender Temperatur bestimmt [Wendorff und Price 1973]: Für Cholesterylnonanoat wurden bei 70 °C und 51 °C Schichtabstände von 27,24 Å und 27,65 Å gemessen (Differenz 0,41 Å). Für Cholesterylmyristat betrugen die Schichtabstände 33,20 Å bzw. 33,95 Å bei 77,6 °C bzw. 63,5 °C (Differenz 0,75 Å).

Der Schichtabstand der smektischen Phase der Cholesterolestermischungen unterscheidet sich von dem der reinen Cholesterolester. So nahm mit zunehmender Cholesterylnonanoat-Konzentration der smektische Schichtabstand der Mischungen von Cholesterylmyristat und -palmitat mit Cholesterylnonanoat nahezu linear ab. Der Einfluss der Cholesterylnonanoat-Konzentration war in den Mischungen mit Palmitat stärker ausgeprägt als in den Mischungen mit Myristat, was auf die größere Differenz in den Fettsäurekettenlängen von 7 C-Atomen in den Palmitat/Nonanoat-Systemen zurückgeführt werden kann. Die Röntgenreflexe der kristallinen Phase verschoben sich mit zunehmender Konzentration des kürzerkettigen Cholesterylnonanoats zu kleineren Winkeln – allerdings in einem geringeren Ausmaß im Vergleich zur smektischen Phase. Die Kristallform wurde durch die längerkettigen Cholesterolester determiniert, und die großen gemessenen Schichtabstände weisen auf eine Bilayer-Kristallform hin (Kapitel 4.1). Es wurden keine zusätzlichen Röntgenreflexe beobachtet. Allerdings waren die kristallinen Reflexe breit und von geringer Intensität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Zumischung von Cholesterolestern mit niedriger Kristallisationstendenz zu Cholesterylpalmitat bzw. -myristat smektische Nanopartikel hergestellt werden können, die bei Lagerung bei 23 °C nicht kristallisieren. Für die Dispersion mit gemischter Cholesterylpalmitat-/oleat-Matrix wurde über den Lagerungszeitraum eine geringfügige Zunahme der Partikelgröße beobachtet. Da insbesondere auch für die entsprechende 10%ige Dispersion ein ähnliches Partikelgrößenwachstum über den Lagerungszeitraum beobachtet wurde (s. Kapitel 4.7), sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine eventuelle Instabilität von smektischen Nanopartikeln mit dieser Matrix-Zusammensetzung aufzuklären. Im Hinblick auf die chemische Stabilität erscheinen Cholesterolestermischungen mit Cholesterylnonanoat von Vorteil. Smektische Nanopartikel mit reiner Cholesterylnonanoat-Matrix erscheinen aufgrund ihrer hohen Stabilität gegenüber Rekristallisation sowie hohen Phasenübergangstemperatur der smektischen Phase vielversprechend. Sie erfordern jedoch die Abklärung toxikologischer Fragestellungen.

Da auch das Stabilisatorsystem die Rekristallisationstendenz smektischer Nanopartikel deutlich beeinflusst (Kapitel 4.4), sollte eine weitere Verminderung der Kristallisationstendenz durch die Stabilisierung der Partikel beispielsweise mit Polyvinylalkohol bzw. Poloxamer möglich sein.

4.6 Einarbeitung von Modellarzneistoffen in smektische Nanopartikel

Ibuprofen, Miconazol, Etomidat und Progesteron wurden in der vorliegenden Arbeit als schwer wasserlösliche, lipophile Modellarzneistoffe für die Herstellung arzneistoffbeladener smektischer Nanopartikel verwendet. Als Modellsystem dienten mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierte schmelzhomogenisierte Cholesterylmyristat-Nanopartikel. Die niedrig schmelzenden Arzneistoffe Ibuprofen, Etomidat und Miconazol wurden zu 10 % (m/m, bezogen auf das Matrixlipid) durch gemeinsames Aufschmelzen mit dem Matrixlipid in die Dispersionen eingearbeitet. Eine höhere Beladung der smektischen Partikel mit diesen Arzneistoffen wurde nicht untersucht. Progesteron, das erst bei Temperaturen deutlich über 100 °C schmilzt, konnte nur zu 1% (m/m, bezogen auf das Matrixlipid) in einem angemessenen Zeitraum (< 30 min) in der Lipidschmelze gelöst werden. Ibuprofen wurde außerdem in eine mit Poloxamin stabilisierte Cholesterylmyristat-Dispersion sowie in smektische Nanopartikel mit einer gemischten Matrix aus Cholesterylmyristat und -oleat eingearbeitet. Eine mit Ibuprofen beladene und mit Poloxamer stabilisierte Dispersion wurde mit dem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellt. Der Arzneistoff und das Matrixlipid wurden hierzu in Cyclohexan gelöst und diese Lösung mit der stabilisatorhaltigen wässrigen Phase bei Raumtemperatur hochdruckhomogenisiert.

Zusammensetzung, Herstellungsparameter, Partikelgröße nach Herstellung sowie die Lage der Röntgenkleinwinkelreflexe der arzneistoffbeladenen Dispersionen sind in Tabelle 4.6.1 zusammengefasst.

4.6.1 Makroskopisches Aussehen und Partikelgröße nach Herstellung der Dispersionen

Nach der Herstellung erschienen alle Dispersionen homogen, mit Ausnahme eines sehr geringfügigen, leicht gräulichen Bodensatzes in einigen Dispersionen (AS1-AS4_RT*), der sich durch manuelles Schütteln leicht redispergieren ließ. Dieser Bodensatz könnte durch die vermutete Verunreinigung des verwendeten Cholesterolesters bzw. durch den Homogenisationsprozess bedingt sein.

Die mittlere Partikelgröße (PCS) der schmelzhomogenisierten Dispersionen lag für die mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Systeme bei ca. 100 nm sowie für die mit Poloxamin stabilisierte Dispersion bei ca. 160 nm (Tab. 4.6.1). In den LD-PIDS-Messungen wurden für alle schmelzhomogenisierten Dispersionen zweigipflige Volumenverteilungen mit Maxima bei ca. 100 und ca. 300 nm erhalten. Die Partikelgrößen sind vergleichbar mit denen

Tabelle 4.6.1: Zusammensetzung, Herstellungsbedingungen, Partikelgröße (nach Herstellung) und Röntgenkleinwinkelreflexe der smektischen Phase der arzneistoffbeladenen Dispersionen

Zusammensetzung		Partikelgröße (nach Herstellung)				Schichtabstand (Å)	
		PCS d (nm)	PI	LD-PIDS Mean (nm)	Median (nm)		D99 (nm)
Schmelzhomogenisation (Microfluidizer) p = 900-1300 bar, 80-90 °C, 5 min							
AS1*	0,5% Ibuprofen 5,0% CM, 3,2% S100, 0,8% SGC	102	0,15	113	95	404	n.g.
AS5	0,5% Ibuprofen 5,0% CM, 3,2% S100, 0,8% SGC	92	0,14	111	93	408	35,2 ³⁾
AS6	0,5% Ibuprofen 5,0% CM, 4% Poloxamin	158	0,15	130	102	428	35,1 ³⁾
AS7	0,5% Ibuprofen 4,0% CM, 1,0% CO, 3,2% S100, 0,8% SGC	97	0,11	107	92	369	35,4 ³⁾
AS2*	0,5% Miconazol 5,0% CM, 3,2% S100, 0,8% SGC	99	0,15	keine stabile Messung nach Herstellung 120 ¹⁾ 98		401	35,1 ³⁾
AS3*	0,5% Etomidat 5,0% CM, 3,2% S100, 0,8% SGC	94	0,16	112	93	401	35,2 ³⁾
AS4*	0,05% Progesteron 5,0% CM, 3,2% S100, 0,8% SGC	99	0,14	115	95	401	35,1 ³⁾
Emulsions-Fällungsverfahren (Microfluidizer): p = 450-950 bar, 20-25 °C, 5 min							
SE10	0,5% Ibuprofen 5,0% CM, 5,0% Poloxamer (20% Cyclohexan)	58	0,15	nicht gemessen			34,7 ²⁾

¹⁾ Messung 12 Monate nach Herstellung. Keine stabile Messung nach Herstellung der Dispersion.²⁾ 1 Monat nach Herstellung,³⁾ 8 Monate nach Herstellung,⁴⁾ 29 Monate nach Herstellung.

unbelasteter Dispersionen gleicher Zusammensetzung, die unter ähnlichen Bedingungen hergestellt wurden. Die mit dem Fällungsverfahren hergestellte Dispersion wies einen PCS z-average von ca. 60 nm auf (Tab. 4.6.1).

4.6.2 Einfluss der Arzneistoffbeladung auf die Eigenschaften und das Phasenverhalten der smektischen Nanopartikel

Physikochemischer Zustand (Röntgenuntersuchungen)

Die bei 23 °C gelagerten arzneistoffbeladenen Dispersionen zeigten den für die smektische Phase charakteristischen Röntgenkleinwinkelreflex (Tab. 4.6.1). Der Abstand der smektischen Schichten wurde durch die Einlagerung der Arzneistoffmoleküle nicht beeinflusst. Für die schmelzhomogenisierten, arzneistoffhaltigen smektischen Cholesterylmyristat-Nanopartikel wurden bei 20 °C Schichtabstände zwischen 35,1 und 35,2 Å gemessen. Der Schichtabstand der durch das Emulsions-Fällungsverfahren hergestellten Dispersion war geringfügig kleiner (34,7 Å, 20 °C). Die ibuprofenhaltige Dispersion mit einer gemischten Cholesterolester-Matrix (80% Cholesterylmyristat, 20% Cholesteryloleat, m/m) zeigte einen Schichtabstand von 35,4 Å bei 20 °C. Auch die Röntgenkleinwinkelreflexe der kristallinen Nanopartikel (bei 4 °C gelagerte Dispersionen) unterschieden sich nicht wesentlich von denen unbelasteter Dispersionen. Für die beladenen, mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Cholesterylmyristat-Dispersionen wurden bei 20 °C Schichtabstände zwischen 51,5 und 51,7 Å gemessen (1. Ordnung). Für die ibuprofenbeladene, mit Poloxamin stabilisierte Dispersion (AS6_KS) wurde ein geringfügig höherer Wert (52,0 Å) ermittelt. Die Nanopartikel mit gemischter Cholesterolester-Matrix kristallisierten auch bei Lagerung im Kühlschrank nicht vollständig. In dieser Dispersion wurde neben den Röntgenkleinwinkelreflexen der kristallinen Phase (51,5 Å, 1. Ordnung, Messung bei 20 °C) auch ein kleiner Reflex bei 36,1 Å beobachtet, der der stark unterkühlten smektischen Phase entspricht.

Phasenverhalten (DSC)

Der Einbau von Arzneistoffen in die Cholesterolester-Matrix führte zu deutlichen Veränderungen im Phasenverhalten. Neben einem Einfluss auf die Kristallisation waren insbesondere die flüssigkristallinen Phasenübergänge zu niedrigeren Temperaturen verschoben.

Die Verschiebung der Temperaturen der flüssigkristallinen Phasenumwandlungen war bei den einzelnen Arzneistoffen unterschiedlich stark ausgeprägt und am geringsten in der mit nur 1%

Progesteron beladenen Dispersion (m/m, bezogen auf die Lipidmatrix, Abb. 4.6.1). Das Phasenverhalten der ibuprofenhaltigen und mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Dispersion änderte sich deutlich über den Lagerungszeitraum. Die flüssigkristallinen Phasenübergänge verschoben sich zu tieferen Temperaturen. Nach 12monatiger Lagerung wurde nur noch ein flüssigkristalliner Phasenübergang beobachtet (Abb. 4.6.1), dessen Enthalpie gut mit der Summe der Enthalpie der Einzelübergänge übereinstimmte. Diese Veränderungen wurden in den zwei gleich zusammengesetzten, aber zu unterschiedlichen Zeiten hergestellten Dispersionen (AS1_RT* und AS5_RT) beobachtet. Auch in den anderen mit Ibuprofen beladenen Dispersionen (AS6_RT, SE10_RT – Stabilisierung mit Poloxamin und AS7_RT – gemischte Cholesterolester-Matrix) kam es über den Lagerungszeitraum zu einer Verschiebung der flüssigkristallinen Phasenübergänge zu tieferen Temperaturen.

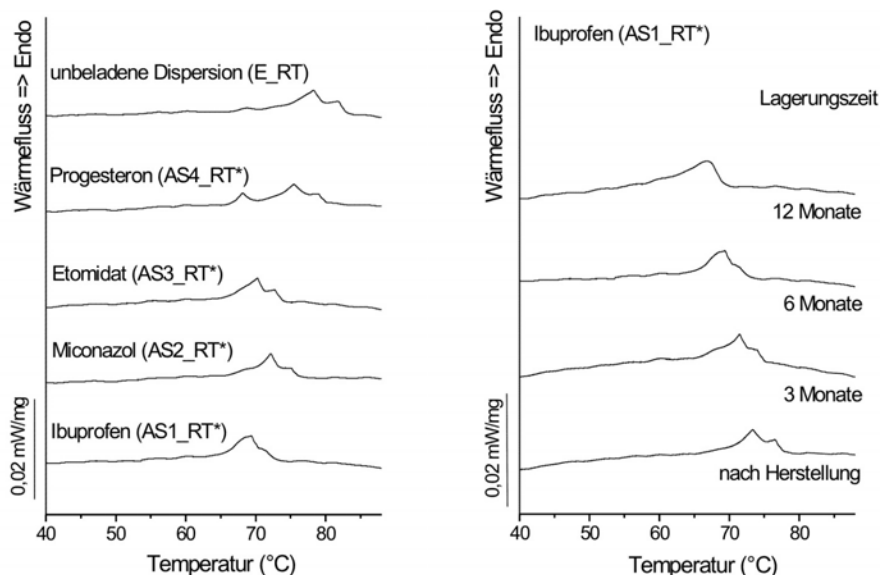


Abbildung 4.6.1: DSC-Heizkurven (5 °C/min) der jeweils thermisch unbehandelten Probe (1. Heizen). Links: Phasenverhalten der mit unterschiedlichen Arzneistoffen beladenen, durch Schmelzhomogenisation hergestellten Dispersionen (5% CM, 3,2% S100, 0,8% NaGC) im Vergleich zu dem einer unbeladenen Dispersion gleicher Zusammensetzung (Messung 6 Monate nach Herstellung). Die progesteronhaltige Dispersion zeigte einen kleinen Schmelzpeak (kristalliner Anteil ca. 2,5%). Rechts: Veränderungen des Phasenverhaltens der ibuprofenbeladenen und mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Cholesterylmyristat-Dispersion über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten.

Die Einlagerung der Arzneistoffe in die Lipidmatrix spiegelte sich weiterhin in einem veränderten Kristallisationsverhalten wider. Eine Abnahme der Kristallisationstemperatur mit zunehmender Lagerungszeit, wie sie auch für unbeladene, auf der Basis von Phospholipiden stabilisierte Cholesterylmyristat-Nanopartikel typisch ist, wurde in allen arzneistoffbeladenen und auf der Basis von Phospholipid stabilisierten Dispersionen beobachtet, allerdings in

unterschiedlichem Ausmaß. Am geringsten wurde die Kristallisation durch den Einbau von 1% Progesteron beeinflusst. Die geringfügig höhere Kristallisationstemperatur der mit Progesteron beladenen Dispersion im Vergleich zu der unbeladenen könnte auf die unterschiedlichen verwendeten Cholesterylmyristat-Chargen zurückgeführt werden (s.a. A.2.1). Während in der unbeladenen Vergleichsdispersion nach 12monatiger Lagerung der kristalline Anteil unter 1% lag, wurde für die mit Progesteron beladenen Nanopartikel ein kristalliner Anteil von ca. 4% nach 12monatiger Lagerung gefunden. In den mit Miconazol und Etomidat beladenen Dispersionen wurde nur ein Kristallisationsereignis beobachtet, das im Vergleich zu der unbeladenen Dispersion zu deutlich niedrigeren Übergangstemperaturen verschoben war (Kristallisation der vorher aufgeschmolzenen Dispersion, Abb. 4.6.2). Die ibuprofenbeladenen Nanopartikel zeigten direkt nach der Herstellung ein ähnliches Kristallisationsverhalten wie die unbeladene Dispersion (zweigipfliges Kristallisationsgeschehen, vergleichbare Onset-Temperaturen). Während der Lagerung kam es jedoch zu einer starken Verringerung der Onset-Temperaturen (Abb. 4.6.2). Nach 12monatiger Lagerung lag die Onset-Kristallisationstemperatur deutlich unter 0 °C.

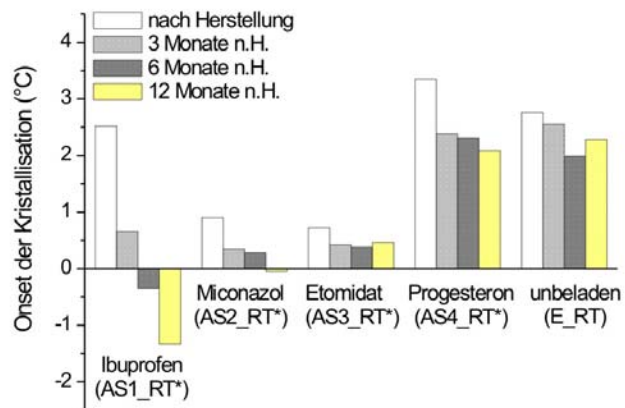


Abbildung 4.6.2: Vergleich der Kristallisationstemperaturen (Kristallisation der aufgeschmolzenen Partikel, Onset des Hauptkristallisationspeaks, DSC 5 °C/min) der mit unterschiedlichen Arzneistoffen beladenen Nanopartikel mit denen einer unbeladener Dispersion ähnlicher Partikelgröße und gleicher Stabilisatorzusammensetzung über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten.

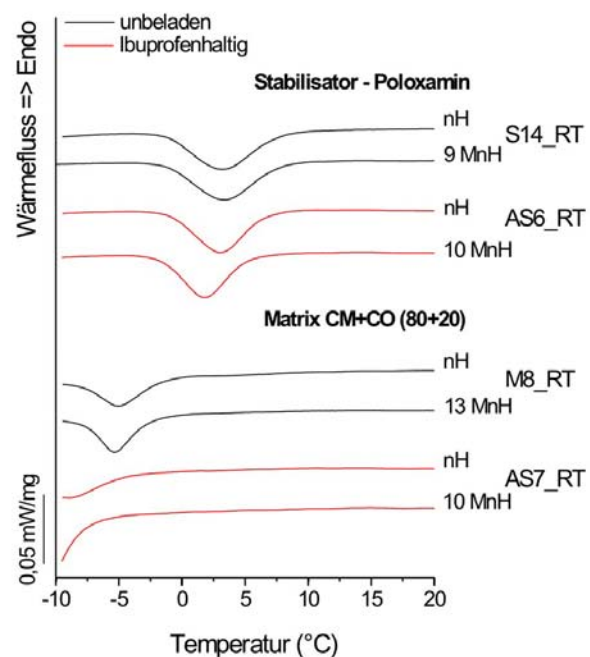


Abbildung 4.6.3: DSC-Kristallisationskurven (Kristallisation der aufgeschmolzenen Partikel, 5 °C/min) der mit Ibuprofen beladenen Dispersionen (rot) im Vergleich zu unbeladenen Dispersionen (schwarz).

Unbeladene, mit Poloxamin stabilisierte Cholesterylmyristat-Nanopartikel zeigten über den Lagerungszeitraum keine deutliche Veränderung ihres Phasenverhaltens. Die Onset-Kristallisationstemperatur variierte zwischen 7,7 bis 7,9 °C über den Lagerungszeitraum von 9 Monaten (S14_RT). Durch die Einarbeitung von Ibuprofen kam es auch hier zu einer leichten Verschiebung der Onset-Kristallisationstemperatur von 6,6 °C (nach Herstellung) auf 5,2 °C (nach 10monatiger Lagerung, Abb. 4.6.3). Eine deutliche Verringerung der Kristallisationstemperatur wurde auch für die mit Ibuprofen beladenen Nanopartikel mit der gemischten Matrix beobachtet. Beim Kühlen auf -13 °C trat keine vollständige Kristallisation ein, so dass eine Bestimmung der Onset- und Peak-Temperatur nicht möglich war. Die unbeladenen Nanopartikel einer Vergleichsdispersion (M8_RT) kristallisierten nach der Herstellung bei -1,6 °C (Onset, Abb. 4.6.3).

4.6.3 Ultrastruktur ibuprofenbeladener Cholesterylmyristat-Nanopartikel

Das Erscheinungsbild der smektischen Nanopartikel im Cryo-Elektronenmikroskop wurde durch den Einbau von Ibuprofen in die Lipidmatrix nicht deutlich beeinflusst. Die mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Dispersion wies neben Liposomen und einigen sphärischen Cholesterylmyristatpartikeln (instabil im Cryo-Elektronenmikroskop, nicht abgebildet) vor allem stabile runde und eckige Partikel auf, was auf eine zumeist annähernd zylinderförmige Gestalt der Partikel hinweist (Kapitel 4.4). Neben diesen wurden auch einige plättchenförmige Partikel beobachtet, obwohl in den DSC-Untersuchungen keine kristallinen Anteile in den Dispersionen nachgewiesen werden konnten. Auffällig war eine häufig stapelförmige Anordnung mehrerer Partikel. Die mit Poloxamin stabilisierte,

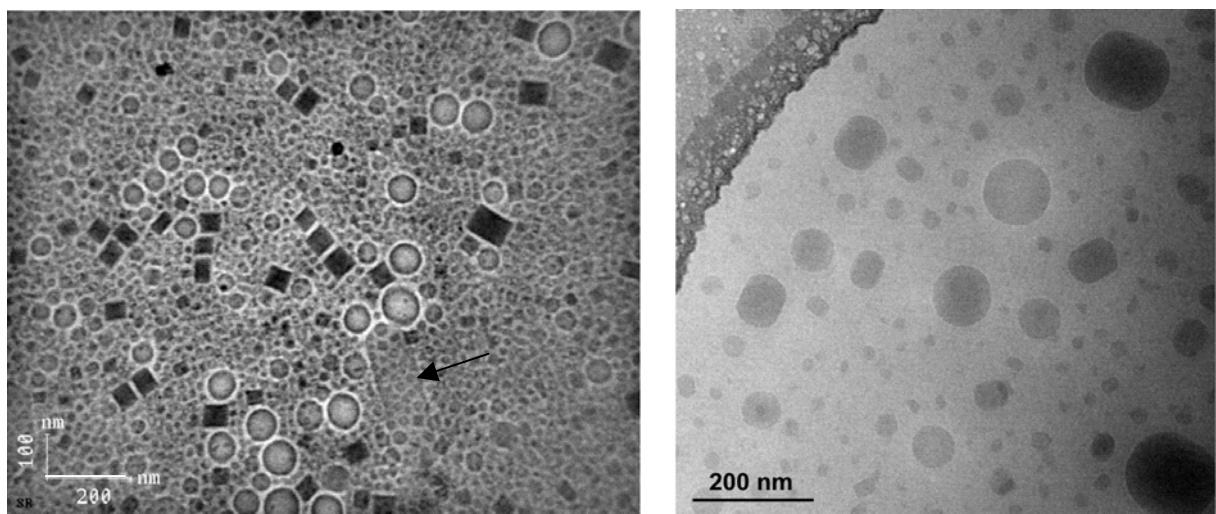


Abbildung 4.6.4: Cryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen ibuprofenbeladener, smektischer Nanopartikel. Links: Mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Nanopartikel (AS1*_RT); ein plättchenförmiges Partikel ist mit einem Pfeil markiert. Rechts: Mit Poloxamin stabilisierte Nanopartikel (AS6_RT).

ibuprofenbeladene Dispersion zeigte ein homogeneres Erscheinungsbild mit einer annähernd zylinderförmigen Gestalt der Partikel, die in der Cryo-Präparation in unterschiedlichen Ausrichtungen zu sehen sind (Abb. 4.6.4)

4.6.4 Lagerstabilität

Mit Ausnahme der mit Progesteron beladenen Dispersion waren alle arzneistoffbeladenen Dispersionen, die durch Schmelzhomogenisation hergestellt wurden, über den Lagerungszeitraum von 9 bzw. 12 Monaten stabil hinsichtlich makroskopischen Aussehens, Partikelgröße (Abb. 4.6.5) und Rekristallisation der Partikel. In der mit Progesteron beladenen Dispersion kam es zu einer geringfügigen Rekristallisation (4% kristalliner Anteil nach 12monatiger Lagerung).

In der mit Poloxamin stabilisierten Dispersion (AS6_RT) wurde nach 9monatiger Lagerung ein kleinerer mittlerer Partikeldurchmesser (PCS) ermittelt. Im Unterschied dazu wurden in den LD-PIDS-Messungen keine Veränderungen der Volumenverteilung beobachtet.

Die mit dem Fällungsverfahren hergestellte Dispersion war über den Beobachtungszeitraum von 5 Monaten stabil hinsichtlich Partikelgröße, makroskopischen Aussehens und smektischen Zustandes der Partikel.

In polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wurden in den

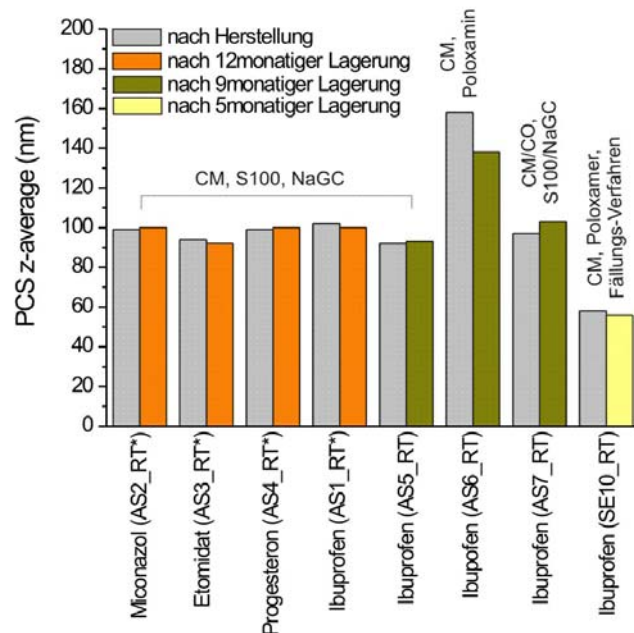


Abbildung 4.6.5: Partikelgröße (PCS) der Dispersionen nach der Herstellung und nach 12, 9 bzw. 5monatiger Lagerung.

Dispersionen AS1_RT*-AS4_RT* auch nach 12monatiger Lagerung keine Arzneistoffpräzipitate detektiert. Die anderen Dispersionen wurden nicht über den gesamten Lagerungszeitraum lichtmikroskopisch untersucht.

4.6.5 Gehaltsbestimmung der arzneistoffbeladenen Dispersionen

Die HPLC-Bestimmungen von Cholesterylmyristat und den Arzneistoffen wurden mit einer Umkehrphasensäule durchgeführt, wobei mit zunehmender Lipophilie der Stoffe die Retention auf der Säule bei gegebener mobiler Phase zunimmt. In der Umkehrphasen-HPLC

werden insbesondere Mischungen von Tetrahydrofuran, Acetonitril und gereinigtem Wasser als mobile Phase verwendet. Bei Gemischen von Tetrahydrofuran und Acetonitril, die bei der Gehaltsbestimmung von Cholesterylmyristat zum Einsatz kamen, wurden die Arzneistoffe mit Ausnahme von Miconazol mit dem injizierten Lösungsmittel eluiert. Für die Gehaltsbestimmung der Arzneistoffe wurden daher Acetonitril/Wasser- bzw. Tetrahydrofuran/Acetonitril/Wasser-Gemische verwendet. Tetrahydrofuran wurde der mobilen Phase zugesetzt, um eine Schulterbildung bzw. Aufspaltung der Peaks zu vermeiden. Dazu kann es kommen, wenn sich die Eigenschaften der mobilen Phase sehr stark von denen des Lösungsmittels der Proben unterscheidet (Abb. 4.6.6 [Unger 1989]). Die Dispersionen wurden (mit Ausnahme der Proben für die Gehaltsbestimmung von Etomidat im Rahmen der Voruntersuchungen) in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Acetonitril (80:20 v/v) gelöst. Da Cholesterolester nur eine geringe UV-Absorption zeigen und folglich relativ hoch konzentrierte Lösungen vermessen werden mussten, war ein hoher Anteil Tetrahydrofuran im Lösungsmittelgemisch notwendig.

Der Gehalt von Miconazol konnte auch mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen der mobilen Phase nicht reproduzierbar bestimmt werden. Die Substanz wurde über einen sehr breiten Zeitraum von der Säule eluiert. Auch mit der sehr lipophilen mobilen Phase bei der Gehaltsbestimmung von Cholesterylmyristat wurde Miconazol nicht mit dem Lösungsmittel eluiert. Der Cholesterylmyristat-Peak war von dem sehr breiten Miconazol-Peak überlagert. Aus diesem Grund wurde auf die Gehaltsbestimmung der miconazolbeladenen Dispersionen verzichtet.

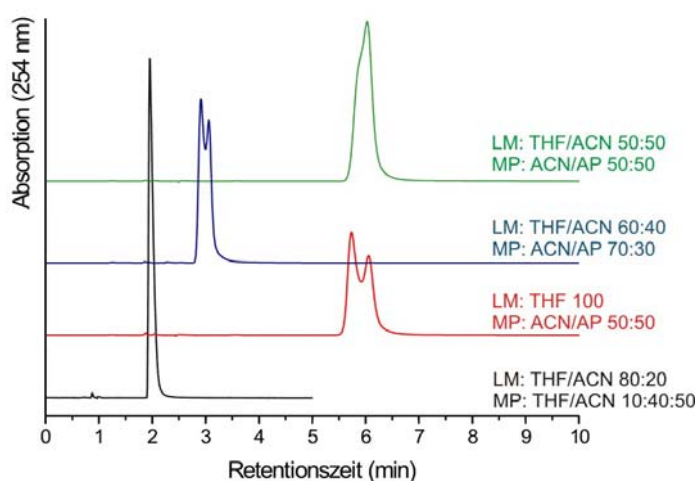


Abbildung 4.6.6: Elutionsprofile von Etomidat in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel (LM) und der mobilen Phase (MP) unter Verwendung einer Umkehrphasensäule (Flussrate 1,5 ml/min). Die Chromatogramme sind nicht auf der gleichen Absorptionsskala dargestellt.

Tabelle 4.6.2: Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der arzneistoffbeladenen Dispersionen.

Dispersion	Gehalt CM (mg/ml Dispersion)	Gehalt Arzneistoff (mg/ml Dispersion)	Arzneistoffgehalt (mg/100 mg CM)
AS3*_RT (Etomidat)	40,5 ± 1,1 ¹⁾	3,64 ± 0,13 ¹⁾	9,0 ± 0,4
AS3*_RT (Etomidat)	39,2 ± 2,4	2,89 ± 0,02	7,4 ± 0,5
AS4*_RT (Progesteron)	38,9 ± 1,8	0,32 ± 0,002	0,82 ± 0,04
AS1*_RT (Ibuprofen)	44,9 ± 1,5 ¹⁾	5,08 ± 0,07 ¹⁾	11,3 ± 0,4
AS5_RT (Ibuprofen)	39,5 ± 1,7	3,96 ± 0,02	10,0 ± 0,4
AS6_RT (Ibuprofen)	38,8 ± 2,1	4,22 ± 0,02	10,9 ± 0,6
AS7_RT (Ibuprofen)	37,9 ± 2,5	4,22 ± 0,01	nicht berechnet ²⁾

¹⁾ Im Rahmen der Voruntersuchungen gemessen. Die Gehaltsangaben beziehen sich auf 1 g Dispersion

²⁾ Gemischte Matrix aus CM/CO.

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung sind in Tabelle 4.6.2 zusammengefasst (s.a. Anhang A.4). Bei der Hochdruckhomogenisation mit dem Microfluidizer kommt es offenbar zu einer recht starken Verdünnung der Dispersionen. Der Cholesterylmyristat-Gehalt der Dispersionen lag meist bei ca. 4%, bezogen auf die Gesamtdispersion (Einwaage 5% bezogen auf die Gesamtdispersion). Aus diesem Grund wurde der Gehalt der Arzneistoffe auf den Cholesterylmyristat-Gehalt zurückgerechnet. In Tabelle 4.6.2 sind weiterhin die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung aufgeführt, die im Rahmen der Methodenentwicklung durchgeführt wurden. Obwohl die Bestimmungen mit unterschiedlichen Methoden und HPLC-Anlagen durchgeführt wurden, besteht eine gute Übereinstimmung in den Gehaltsbestimmungen von Cholesterylmyristat für die etomidatbeladene Dispersion (Tab. 4.6.2). Der geringe Gehalt an Etomidat in den Dispersionen, insbesondere in den späteren Bestimmungen, ist wahrscheinlich auf eine teilweise Hydrolyse des Etomidats zurückzuführen. Die beiden HPLC-Untersuchungen wurden im Abstand von ca. 2 Jahren durchgeführt. Der deutlich niedrigere Gehalt der späteren Messung (ca. 7% bezogen auf CM vs. 9% der früheren Messung) weist auf eine Diffusion des Etomidats aus der Lipidmatrix in die wässrige Phase und anschließende Hydrolyse hin.

4.6.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die schwer wasserlöslichen Modellarzneistoffe Ibuprofen, Etomidat, Miconazol und Progesteron konnten in Dispersionen smektischer Nanopartikel eingearbeitet werden. Während die niedrig schmelzenden Arzneistoffe Ibuprofen, Etomidat und Miconazol zu 10% (m/m bezogen auf die Lipidmatrix) durch gemeinsames Aufschmelzen mit dem Lipid in die Dispersionen eingearbeitet werden konnten, konnte Progesteron, das erst bei Temperaturen

deutlich über 100 °C schmilzt, nur 1%ig in der Lipidschmelze gelöst werden. Alle Dispersionen waren stabil hinsichtlich Partikelgröße und physikochemischen Zustand über den Lagerungszeitraum von mindestens 9 (schmelzhomogenisierte Dispersionen) bzw. 5 (Herstellung der Dispersion mittels Fällungsverfahren) Monaten. Nur in der mit Progesteron beladenen Dispersion wurden nach 12monatiger Lagerung eine geringe Menge von kristallinem Matrixlipid nachgewiesen.

Die Einarbeitung der Arzneistoffe hatte keine Veränderung des smektischen Schichtabstandes zur Folge. Die Einlagerung der Arzneistoffe in die Cholesterolester-Nanopartikel spiegelte sich jedoch in einem veränderten Phasenverhalten wider. Progesteron, dessen Konzentration nur 1% (bezogen auf die Lipidmatrix, m/m) betrug, bewirkte nur eine geringfügige Verschiebung der Phasenübergänge zu tieferen Temperaturen. Bei den anderen drei Arzneistoffen war der Einfluss auf das Phasenverhalten des Matrixlipids unterschiedlich stark ausgeprägt und am deutlichsten bei Ibuprofen. Ibuprofenbeladene smektische Nanopartikel zeigten über den Lagerungszeitraum von 12 Monaten eine deutliche Verringerung der Phasenübergangstemperaturen (Abb. 4.6.1), was auf eine Veränderung der Matrixzusammensetzung hinweist. Denkbar wäre eine anfängliche Anreicherung des Ibuprofens insbesondere in der Grenzfläche der Nanopartikel bzw. eine bevorzugte Solubilisierung in anderen in den Dispersionen vorhandenen kolloidalen Strukturen wie Liposomen und Mizellen und eine nachfolgende Umverteilung in die Cholesterolestermatrix. Miconazolbeladene Dispersionen zeigten Probleme bei den Partikelgrößenmessungen, insbesondere nach Herstellung der Dispersion. Ähnliches wurde auch bei miconazolbeladenen festen Lipid- und kubischen Nanopartikeln beobachtet [Bunjes 1998, Wörle et al. 2006]. Über den Lagerungszeitraum kam es zu einer Stabilisierung des Systems. Nach 12monatiger Lagerung wurden keine Instabilitäten während der Partikelgrößenmessungen beobachtet.

In den HPLC-Untersuchungen wurde in allen Dispersionen ein deutlich geringerer Cholesterylmyristat-Gehalt festgestellt als im Herstellungsansatz eingesetzt, was insbesondere auf die relativ starke Verdünnung bei der Homogenisation mit dem Microfluidizer zurückgeführt werden kann. Des Weiteren ist eine zumindest geringfügige Hydrolyse des Cholesterolesters während der Herstellung sowie Lagerung der Dispersionen nicht auszuschließen. Aufgrund der relativ geringen Absorption und der geringen Absorptionswellenlänge (213 nm), bei der auch die verwendeten Lösungsmittel (insbesondere Tetrahydrofuran) eine Absorption zeigen, waren für die Gehaltsbestimmungen hohe Cholesterylmyristat-Konzentrationen notwendig. Schon eine geringfügige Verdunstung des Lösungsmittels beispielsweise bei der Probenpräparation hatte einen großen Fehler in der

Gehaltsanalyse zur Folge. Im Vergleich zu den Gehaltsbestimmungen der Arzneistoffe wiesen die Ergebnisse der Cholesterylmyristat-Messungen deutlich stärkere Abweichungen auf. Für zukünftige Untersuchungen erscheint die Verwendung eines anderen Detektionssystems – z.B. ein Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektor (ELSD: Evaporating Light Scattering Detector), der auch für die quantitative Analyse anderer Lipide eingesetzt wird [Christie 2003, Morera et al. 2003] – sinnvoll. Miconazol konnte mit der verwendeten HPLC-Methode nicht quantitativ bestimmt werden, da dieser Arzneistoff bei den unterschiedlichsten verwendeten mobilen Phasen eine ausgeprägte Verschmierung der Elution (tailing) zeigte, was auf eine starke Wechselwirkung des Arzneistoffs mit dem Säulenmaterial hinweist [Meyer 1992]. Der Gehalt von Etomidat nahm über den Lagerungszeitraum von ca. 2 Jahren ab, was durch eine fortschreitende Hydrolyse des in der wässrigen Phase gelösten Anteils des Arzneistoffs bedingt sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass smektische Nanopartikel für die Solubilisierung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe geeignet sind. Untersuchungen zur Freisetzung und auch Lokalisation eingearbeiteter Arzneistoffe sind notwendig für die Beurteilung des Potentials smektischer Nanopartikel für eine langsame Wirkstofffreisetzung, wobei jedoch eine ausreichend hohe Lipophilie und Affinität der Arzneistoffe zur Lipidmatrix erforderlich sind. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arzneistoffe ist eine langsame Freisetzung nach starker Verdünnung (sink-Bedingungen) eher unwahrscheinlich. Die logP-Werte (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten), die zur Abschätzung der Verteilung der Substanzen zwischen einer lipophilen und hydrophilen Phase dienen, sind für Ibuprofen, Etomidat, Miconazol und Progesteron mit 3,5, 2,7, 6,0 bzw. 4,0 angegeben¹ [PubChem]. Für Cholesterylmyristat ergibt sich ein logP-Wert von 13,4. Das ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der HPLC-Untersuchungen, bei denen – mit Ausnahme des Miconazols – für Retention der Arzneistoffe im Vergleich zu den Cholesterolestern ein deutlich hydrophileres Laufmittel notwendig war.

Eine Erhöhung der Lipophilie bzw. Affinität zum Matrixlipid der Arzneistoffe kann durch physikalische bzw. chemische Modifizierung der Arzneistoffe erfolgen. So können die Löslichkeitseigenschaften von ionischen Arzneistoffen durch Ionenpaarbildung verändert werden. Cavalli et al. arbeiteten Komplexe von Pilocarpin [Cavalli et al. 1995], Doxorubicin und Idarubicin [Cavalli et al. 1993] mit Alkylphosphaten in feste Stearinsäure-Nanopartikel ein. Mit zunehmender Fettsäurekettenlänge wurde in einem Dialyseexperiment für die

¹ Theoretische logP-Werte, berechnet auf Grundlage der Strukturformeln [Wang et al. 1997].

Pilocarpin-Alkylphosphat-Komplexe ein langsames Erscheinen des Arzneistoffs im Akzeptormedium beobachtet [Cavalli et al. 1995]. Murtha und Ando beschreiben die Synthese von Cholesteryl-Ibuprofen und Cholesteryl-Flufenamat sowie die Einarbeitung dieser Prodrugs in Phospholipid-Mikroemulsionen [Murtha und Ando 1994]. Die binären Mischungen der Prodrugs mit Cholesteryl-oleat wiesen auf ein Eutektikum bei ca. 16% Cholesteryl-Ibuprofen bzw. 12% Cholesteryl-Flufenamat und 84% bzw. 88% Cholesteryl-oleat hin. Solche Cholesterolester-Prodrugs scheinen auch geeignete Kandidaten für Arzneistoffbeladung smektischer Nanopartikel zu sein. Versluis et al. synthetisierten ein lipophiles Daunorubicin-Derivat (LAD), das in LDL-ähnliche Partikel inkorporiert wurde. Als lipophiler Bestandteil wurde Cholesteryl-oleat über eine enzymatisch spaltbare Peptidbindung an Daunorubicin gebunden [Versluis et al. 1998]. Auch lipophile Prodrugs von Paclitaxel und Etoposid wurden nach Einarbeitung in LDL-ähnliche Partikel für ein zielgerichtetes LDL-Rezeptor-Targeting verwendet [Rodrigues et al. 2005, Valduga et al. 2003].

4.7 Höher konzentrierte Dispersionen smektischer Nanopartikel

Eine höhere Konzentration der Nanopartikel kann wünschenswert oder auch erforderlich sein, um beispielsweise eine ausreichend hohe Dosierung des Arzneistoffs bei gleicher Beladungskapazität des Matrixlipids zu erreichen. Aus diesem Grund wurden verschiedene 10%ige Dispersionen smektischer Nanopartikel hergestellt (Tab. 4.7.1), um die Auswirkungen einer höheren Konzentration des Matrixlipids auf Partikelgröße, Phasenverhalten sowie Stabilität der Dispersionen zu untersuchen. Weiterhin wurden für die Zellkulturversuche 10%ige Dispersionen verwendet, um die der Zellkultur zuzusetzende Probenmenge möglichst gering zu halten (s. Kapitel 4.9). Aufgrund der Besonderheiten im Phasenverhalten ist die poloxamerstabilisierte Dispersion, die für die Zellkulturuntersuchungen verwendet wurde, in diesem Kapitel mitdiskutiert. Diese Dispersion wurde nach der Herstellung autoklaviert und nicht über einen längeren Lagerungszeitraum beobachtet.

Tabelle 4.7.1: Zusammensetzung, Herstellungsbedingungen und Partikelgröße 10%iger Dispersionen nach der Herstellung.

Dispersion	Zusammensetzung	Herstellungsbedingungen	Partikelgröße nach Herstellung		
			PCS d (nm)	PI	LD-PIDS D99 (nm)
V3_RT	10% CM 6,4% S100, 1,6% NaGC	1100-1200 bar 80-85 °C 5 min	107	0,14	391
V4_RT	8% CM, 2% CO 6,4% S100, 1,6% NaGC	1100 bar 75-80 °C 5 min	91	0,18	408
V5_RT	6% CP, 4% CN 6,4% S100, 1,6% NaGC	1100 bar 75-80 °C 5 min	111	0,15	404
V6_RT	5% CP, 5% CO 6,4% S100, 1,6% NaGC	1000 bar 75-80 bar 5 min	108	0,13	406
V7_RT	10% CM 5% PVA	1000 bar 75-80 °C 5 min	136	0,13	437
V8_RT	10% CM 5% Na-Caseinat	1000 bar 75-80 °C 5 min	183	0,10	444
ZK3_RT	10% CM 8% Poloxamer 188	930-1000 bar 85 °C 5 min Autoklavierung	171	0,07	n.g.

Nach der Schmelzhomogenisation erschienen alle Dispersionen homogen. Die mittlere Partikelgröße (PCS) war vergleichbar mit der von den entsprechenden 5%igen.

Mit Ausnahme der Dispersion mit der gemischten Cholesterylpalmitat/-oleat-Matrix (50+50%), in der über den Lagerungszeitraum eine deutliche Partikelgrößenzunahme beobachtet wurde, waren die Dispersionen über den Lagerungszeitraum von 6 Monaten hinsichtlich des makroskopischen Aussehens sowie der mittleren

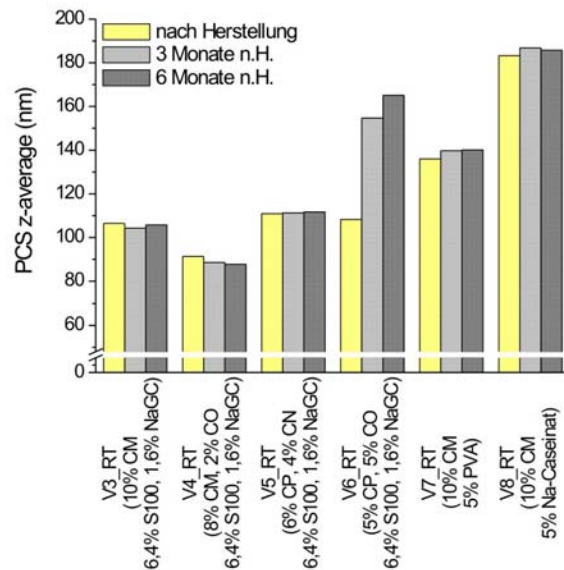


Abbildung 4.7.1: Mittlere Partikelgröße (PCS) nach Herstellung und nach Lagerung der Dispersionen.

Partikelgröße stabil (Abb. 4.7.1). Kristalline Cholesterolster-Anteile wurden nur in den Dispersionen mit reiner Cholesterylmyristat-Matrix detektiert und lagen nach 6monatiger Lagerung unter 2%. In den Dispersionen mit gemischter Cholesterolstermatrix wurde keine Rekristallisation beobachtet.

Die Röntgenkleinwinkelreflexe der Dispersionen (Tab. 4.7.2) sind vergleichbar mit denen von 5%igen Dispersionen gleicher Zusammensetzung. Nur für die smektischen Nanopartikel mit der gemischten Cholesterolster-Matrix mit Cholesterylpalmitat wurden geringfügig höhere Werte gemessen.

Tabelle 4.7.2: Röntgenkleinwinkelreflexe der bei 23 °C gelagerten Dispersionen (Messung 17 Monate nach Herstellung bei 20 °C).

Dispersion ¹⁾	Zusammensetzung	Schichtabstand der smektischen Phase (Å)
V3_RT	10% CM, 6,4% S100, 1,6% NaGC	35,1
V4_RT	8% CM, 2% CO, 6,4% S100, 1,6% NaGC	35,3
V5_RT	6% CP, 4% CN, 6,4% S100, 1,6% NaGC	34,3
V6_RT	5% CP, 5% CO, 6,4% S100, 1,6% NaGC	37,8
V7_RT	10% CM, 5% PVA	35,0
V8_RT	10% CM, 5% Na-Caseinat	35,1

¹⁾ Die Dispersion ZK3_RT wurden röntgendiffraktometrisch nicht untersucht.

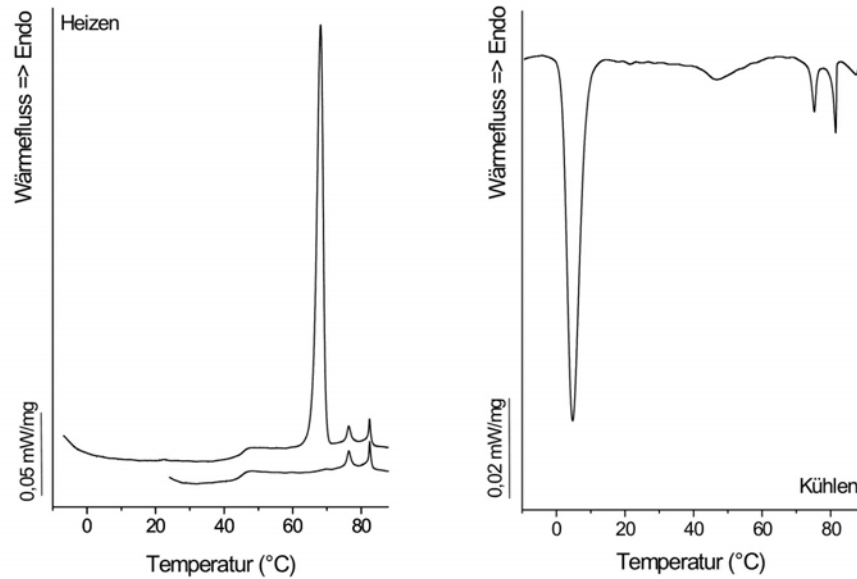


Abbildung 4.7.2: DSC-Heiz- und Kühlkurven (5 °C/min) einer 10%igen, mit 8% Poloxamer 188 stabilisierten Dispersion (ZK3_RT).

Die mit 8% Poloxamer stabilisierte Dispersion (ZK3_RT) zeigte in der DSC in den Heiz- und Kühlvorgängen neben den für Cholesterylmyristat typischen Phasenübergängen auch Ereignisse, die auf das Poloxamer zurückzuführen sind (Abb. 4.7.2). In beiden Heizvorgängen wurde ein einem Glasübergang ähnliches Ereignis bei 45,2 °C (1. Heizen) und im Kühlvorgang ein exothermer Übergang bei 58,2 °C (Onset) mit einer Enthalpie von -0,53 J/g beobachtet. Ähnliche Übergänge wurden in den anderen poloxamerstabilisierten 5%igen Dispersionen, die maximal 4% Poloxamer enthielten, nicht detektiert.

Die beobachteten Übergänge sind wahrscheinlich auf eine Mizellbildung des Poloxamers zurückzuführen. Die Mizellbildung der PEO-PPO-Block-Copolymere ist komplex und neben der Polymerkonzentration unter anderem auch von der Temperatur und Elektrolytkonzentration abhängig [Alexandridis und Hatton 1995, Hecht und Hoffmann 1995, Gainsford et al. 1998]. Des Weiteren zeigen hochkonzentrierte Poloxamer-Lösungen eine temperaturabhängige Gelbildung [Scherlund et al. 2000]. Durch Additive, wie beispielsweise lipophile Arzneistoffe, kommt es zu einer Verringerung sowohl der Mizellbildungs- als auch der Gelbildungstemperatur [Scherlund et al. 2000].

Die Abhängigkeit der Mizellbildungstemperatur von der Konzentration wässriger Lösungen des für die Stabilisierung der Dispersionen verwendeten Poloxamers 188 (2-10% m/m in TRIS-Puffer 10 mM, pH 7.4) wurde in der DSC untersucht (Abb. 4.7.3). Für alle Lösungen wurde ein endothermes, einem Glasübergang ähnliches Ereignis in den Heizvorgängen beobachtet, das auf die Mizellbildung zurückgeführt werden kann [Hecht und Hoffmann

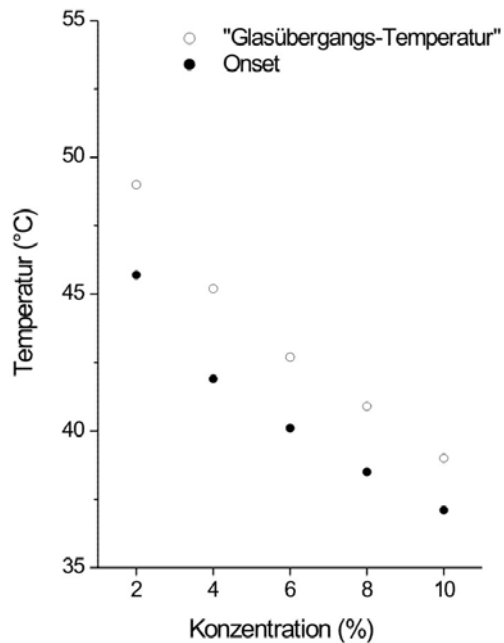


Abbildung 4.7.3: Abhängigkeit der Phasenübergangs-Temperaturen (DSC, 5 °C/min, Heizen) von der Poloxamer-Konzentration. Poloxamer 188 in TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,4).

1995]. Die Mizellbildung war reversibel. In den anschließenden Kühlvorgängen wurde ein exothermes Ereignis beobachtet.

Mit zunehmender Poloxamer-Konzentration nahm die Phasenübergangstemperatur ab (Abb. 4.7.3) sowie die Enthalpie zu. In der 2%igen Lösung waren die Übergänge nur noch sehr klein und schwer zu detektieren. Die in der Cholesterylmyristat-Dispersion gemessene Übergangstemperatur ("Glasübergangstemperatur" 45,2 °C) scheint auf eine Konzentration von ca. 4% freiem Polymer in der Dispersion hinzuweisen. Der Übergang war in der Dispersion jedoch stärker ausgeprägt als in der Poloxamer-Lösung. Des Weiteren wurde der exotherme Übergang in den Kühlprozessen der Poloxamer-Lösungen bei

tieferen Temperaturen beobachtet als in der Dispersion (Onset 52,8 °C bzw. 58,2 °C für die 4%ige Poloxamer-Lösung bzw. die Dispersion ZK3_RT). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die wässrigen Phasen nicht die gleiche Zusammensetzung aufwiesen, was die Mizellbildung beeinflussen kann. Eine weitere Verfeinerung der Methode erscheint interessant im Hinblick auf eine mögliche Quantifizierungsmöglichkeit des Anteils freien Polymers in den Dispersionen. Nach den Ergebnissen der 10%igen mit 8% Poloxamer stabilisierten Cholesterylmyristat-Dispersion, sollte der Anteil an freiem Polymer der entsprechenden 5%igen Dispersion (4% Poloxamer) bei ca. 2% liegen. In den DSC-Messungen dieser Dispersion wurden jedoch nur die Phasenübergänge detektiert, die auf das Matrixlipid zurückgeführt werden können. Das könnte allerdings durch die nicht ausreichende Empfindlichkeit des verwendeten Messgerätes bedingt sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass höherkonzentrierte Dispersionen smektischer Nanopartikel hergestellt werden können. Die 10%igen Dispersionen unterschieden sich nicht deutlich von den entsprechenden 5%igen Dispersionen. Eine höhere Konzentration an Matrixlipid erscheint insbesondere im Hinblick auf eine möglichst geringe zu applizierende Menge Dispersion günstig. Aus diesem Grund wurden für in vitro-Zytotoxizitätsuntersuchungen 10%ige Dispersionen eingesetzt. Eine weitere Erhöhung der Lipidkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

4.8 Autoklavierung und Stabilität gegenüber thermischer Belastung

Für parenterale Zubereitungen sowie für Zubereitungen zur Anwendung am Auge wird Sterilität gefordert [Ph.Eur.]. Sterilität ist weiterhin für biologische Studien wie beispielsweise Zellkulturuntersuchungen notwendig. Standardmethode für wässrige Zubereitungen ist die Sterilisation mit gespanntem gesättigten Wasserdampf (Autoklavierung [Ph.Eur.]). Ist diese nicht möglich, kann eine Zubereitung durch Filtration mittels eines Bakterien zurückhaltenden Membranfilters mit einer nominellen Porenweite von 0,2 µm sterilisiert werden. Eine Sterilfiltration kolloidaler Lipid-Dispersionen kann jedoch nur bei ausreichend geringer Partikelgröße erfolgen [Lidgate et al. 1992].

Wenn möglich, wurden die Dispersionen direkt nach der Herstellung im warmen Zustand durch einen 0,2 µm-Filter in Vials abgefüllt. Einige Dispersionen, insbesondere mit größeren mittleren Partikeldurchmessern, konnten nur durch einen 5 µm-Filter filtriert werden. Nach Lagerung war eine Filtration vor allem der im Kühlschrank gelagerten Dispersionen nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde die physikalische wie auch chemische Stabilität bei Autoklavierung ausgewählter Dispersionen untersucht. 5%ige Cholesterylmyristat-Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren (Phospholipid/Gallensalz, Polyvinylalkohol, Poloxamer und Poloxamin) wurden bei 121 °C und 2 bar für 15 min autoklaviert und anschließend hinsichtlich Partikelgröße, Phasenverhalten und chemischer Stabilität untersucht. Zur Untersuchung des Einflusses der thermischen Belastung wurde zudem eine mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Dispersion für unterschiedlich lange Zeiten bei 90 °C gelagert.

4.8.1 Phospholipid/Gallensalz stabilisierte Dispersionen

Zwei mit Phospholipid und Gallensalz stabilisierte Dispersionen mit unterschiedlichen Partikelgrößen (C_RT und E_RT: 3,2% PL S100, 0,8% NaGC) wurden direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert.

Nach der Autoklavierung wurden keine Veränderungen des makroskopischen Aussehens, der Partikelgröße und des Phasenverhaltens dieser Dispersionen beobachtet (Tab. 4.8.1). Es kam lediglich zu einer geringfügigen Erhöhung des Zetapotentials, was auf eine gewisse Hydrolyse des Phospholipids hinweist. In der dünnschichtchromatographischen Untersuchung (TLC) wurde ein geringfügig höherer Gehalt an Lysophosphatidylcholin und freien Fettsäuren in beiden autoklavierten Dispersionen gefunden (s.u., Abb. 4.8.3).

Tabelle 4.8.1: Partikelgröße und Zetapotential der Dispersionen vor und nach der Autoklavierung.

	Partikelgröße					Zetapotential (mV)
	PCS		LD-PIDS			
	d (nm)	PI	Mean (nm)	Median (nm)	D99 (nm)	
C_RT	130	0,12	126	104	389	-38
C_RT_auto	131	0,14	126	104	385	-42
E_RT	94	0,14	109	92	395	-40
E_RT_auto	93	0,15	110	93	404	-46

Für die Untersuchung des Einflusses einer auch länger dauernden Erwärmung wurde jeweils ein Teil einer Dispersion gleicher Zusammensetzung (V2_RT) für 24 und 48 Stunden bei 90 °C in einem Heißluftschrank gelagert. Mit zunehmender Zeitdauer der thermischen Behandlung kam es zu einer gelblichen Verfärbung der Dispersionen (Abb. 4.8.1). Ein Partikelgrößenwachstum

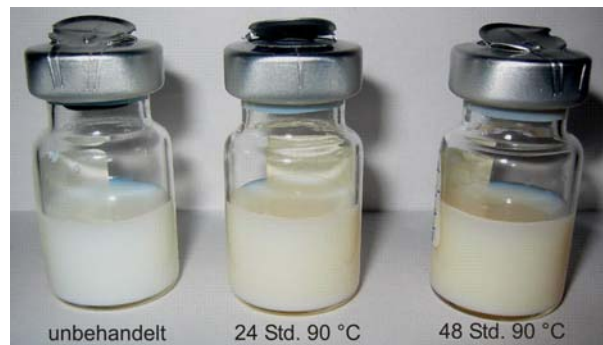


Abbildung 4.8.1: Makroskopisches Aussehen der Dispersionen in Abhängigkeit von der thermischen Behandlung.

wurde jedoch auch bei lang andauernder thermischer Belastung nicht beobachtet. Mit zunehmender thermischer Belastung nahm das Zetapotential zu (Tab. 4.8.2). Eine Zunahme des Gehalts an Lysophosphatidylcholin und auch der freien Fettsäuren wurde in der dünnschichtchromatographischen Untersuchung beobachtet (s.u., Abb. 4.8.3).

Nach länger dauernder thermischer Belastung der Dispersionen wurden Veränderungen im Kristallisationsverhalten der Nanopartikel beobachtet. Mit zunehmender Zeitdauer der thermischen Behandlung verschob sich im Kühlvorgang der vorher aufgeschmolzenen

Tabelle 4.8.2: Partikelgröße und Zetapotential einer Dispersion (V2_RT) in Abhängigkeit von der Zeitdauer der thermischen Behandlung (90 °C).

	Partikelgröße					Zetapotential (mV)
	PCS		LD-PIDS			
	d (nm)	PI	Mean (nm)	Median (nm)	D99 (nm)	
unbehandelt	109	0,13	114	96	377	-30
24 Std. 90 °C	112	0,15		nicht gemessen		-36
48 Std. 90 °C	111	0,15	113	95	380	-43

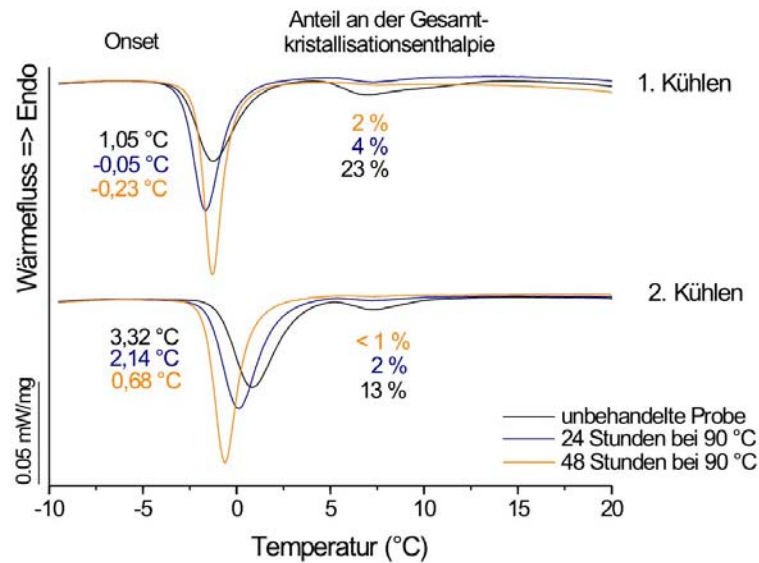


Abbildung 4.8.2: DSC-Kühlkurven (5 °C/min) in Abhängigkeit von der thermischen Vorbehandlung. Die Dispersionen wurden mit 5 °C/min auf -13 °C abgekühlt (1. Kühlen), auf 90 °C aufgeheizt (nicht dargestellt) und noch einmal auf -13 °C abgekühlt (2. Kühlen).

Dispersion das Hauptkristallisationsereignis zu tieferen Temperaturen. Die Fläche unter dem Kristallisationsereignis bei höheren Temperaturen nahm ab (Abb. 4.8.2), während die flüssigkristallinen Phasenumwandlungen sowie auch der Schmelzvorgang nicht deutlich durch die thermische Behandlung beeinflusst wurden. Ähnliche Veränderungen im Kristallisationsverhalten wurden auch in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Dispersionen beobachtet (Kapitel 4.4).

Der Einfluss der thermischen Belastung auf die chemische Stabilität der Dispersionen wurde dünnschichtchromatographisch untersucht. Durch die Autoklavierung kam es zu einer geringfügigen Hydrolyse des Phospholipids (Abnahme des Phospholipid-Gehalts, Zunahme des Gehalts an Lysophosphatidylcholin und freien Fettsäuren, Abb. 4.8.3). Erst nach länger dauernder thermischer Belastung (48 Stunden bei 90 °C) wurde eine deutliche Hydrolyse des Phospholipids beobachtet (Abnahme des Phospholipid-Gehalts um ca. 25%, Abb. 4.8.4). Zum Vergleich des Ausmaßes der Hydrolyse der Phospholipide in den Cholesterylmyristat-Dispersionen wurden verschiedene Phospholipide (Lipoid E80, Lipoid S75 und Lipoid S100) durch manuelles Schütteln in Wasser dispergiert (10 mg/ml) und für 24 Stunden bei 40 °C bzw. 80 °C im Heißluftschrank gelagert. Nach 24stündiger Lagerung bei 80 °C kam es zu einem deutlichen Abbau der Phospholipide sowie einer Zunahme an Lysophosphatidylcholin (Abb. 4.8.3 und Abb. 4.8.4). Auch in den bei 40 °C gelagerten wässrigen Phospholipid-Dispersionen waren schon geringe Mengen Lysophosphatidylcholin nachweisbar. Im

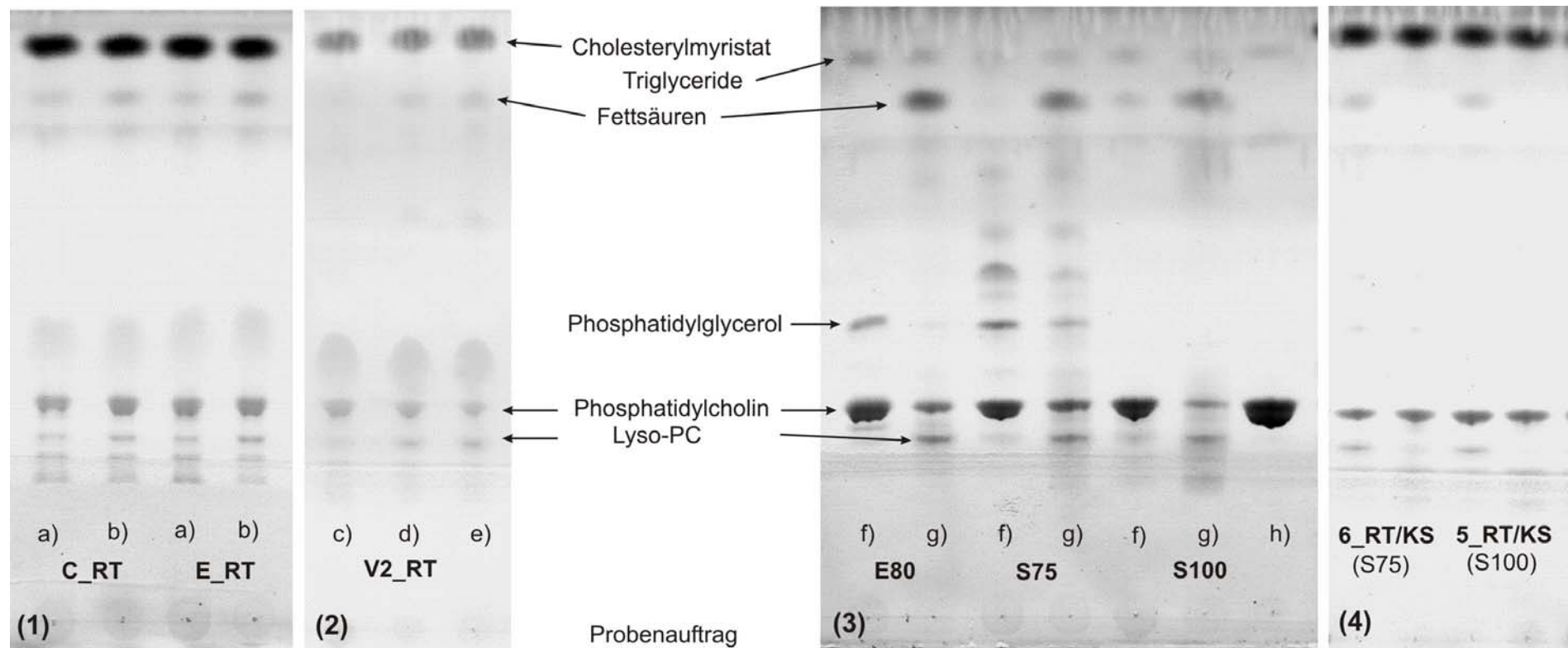


Abbildung 4.8.3: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von 5%igen, auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Cholesterylmyristat-Dispersionen und reiner Phospholipid-Dispersionen.

- (1) Einfluss der Autoklavierung: a) nicht autoklavierte und b) autoklavierte Dispersion.
- (2) Einfluss länger dauernder thermischer Belastung: c) unbehandelte Dispersion (Lagerung bei 23 °C) und Lagerung der Dispersionen bei 90 °C für d) 24 Stunden und e) 48 Stunden.
- (3) Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Hydrolyse wässriger Phospholipid-Dispersionen (10 mg/ml): 24stündige Lagerung bei f) 40 °C und g) 80 °C; h) Lösung von S100 in Methanol/Chloroform (50:50 V/V) und
- (4) Ausmaß der Hydrolyse der Phospholipide in den Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (RT: 23 °C, KS: 4 °C) nach sehr langer Lagerungszeit (44 Monate).

Gegensatz dazu wurde in einer Lösung des Phospholipids S100 in Chloroform/Methanol (50:50 V/V) kein Lysophosphatidylcholin detektiert (Abb. 4.8.3). Obwohl in allen untersuchten Cholesterolester-Dispersionen – auch den nicht autoklavierten – Lysophosphatidylcholin nachweisbar war, war das Ausmaß der Hydrolyse in diesen Dispersionen trotz der thermischen Belastung während der Herstellung sowie auch bei Autoklavierung und längerer Lagerung bei 90 °C deutlich geringer ausgeprägt im Vergleich zu den reinen wässrigen Phospholipid-Dispersionen (Abb. 4.8.4). Um das Ausmaß der Hydrolyse der Phospholipide in den Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur abzuschätzen, wurden zwei Dispersionen (5_RT/KS: 5% CM, 3,2% S100 und 6_RT/KS: 5% CM, 3,2% S75) nach einem sehr langen Lagerungszeitraum von 44 Monaten dünnenschichtchromatographisch untersucht. In den bei 23 °C gelagerten Dispersionen (smektische Partikel) war der Gehalt an Lysophosphatidylcholin sowie freien Fettsäuren deutlich höher als in den bei 4 °C gelagerten (kristalline Partikel, Abb. 4.8.3).

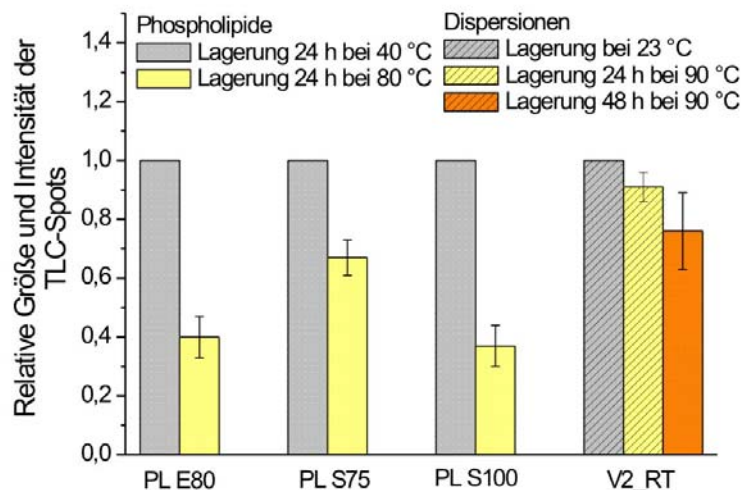


Abbildung 4.8.4: Abnahme des Phosphatidylcholin-Gehalts in Abhängigkeit von der thermischen Behandlung wässriger Dispersionen der Phospholipide E80, S75 bzw. S100 (10 mg/ml) und einer kolloidalen Cholesterylmyristat-Dispersion (V2_RT). Es ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen angegeben. Als Bezugsgrößen dienten die bei 40 °C gelagerten wässrigen Phospholipid-Dispersionen bzw. die thermisch unbehandelte, bei 23 °C gelagerte Dispersion.

4.8.2 Polymerstabilisierte Dispersionen

Die polymerstabilisierten Dispersionen wurden 7 (S17_RT – Poloxamer) bzw. 21 Monate (S6_RT – PVA, S14_RT – Poloxamin) nach Herstellung der Dispersionen autoklaviert. Mit Ausnahme einer leichten gelblichen Verfärbung der mit Poloxamin stabilisierten Dispersion waren die verwendeten Systeme hinsichtlich des makroskopischen Aussehens, der Partikelgröße und dem smektischen Zustand der Partikel über diesen Lagerungszeitraum stabil (Abb. 4.8.5). Durch die Autoklavierung wurde das makroskopische Aussehen der Dispersionen nicht verändert. Während in der mit Polyvinylalkohol stabilisierten Dispersion keine Zunahme der mittleren Partikelgröße beobachtet wurde, kam es in den mit Poloxamer und Poloxamin stabilisierten Dispersionen durch die Autoklavierung zu einem Anstieg der Partikelgröße in den PCS- (Abb.

4.8.5) und LD-PIDS-Messungen.

Auffällig waren die kleineren PI-Werte in beiden Dispersionen nach der Autoklavierung. So wurde für die mit Poloxamer stabilisierten Dispersionen vor der Autoklavierung ein Polydispersitätsindex von 0,11 gemessen und nach der Autoklavierung von 0,08. In der mit Poloxamin stabilisierten Dispersion wurde eine ähnliche Abnahme des

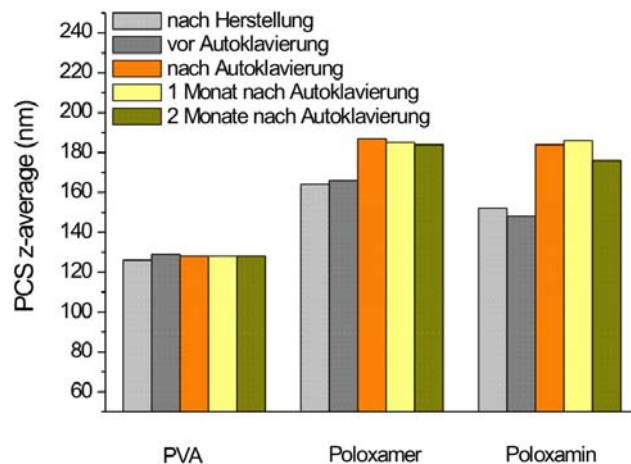


Abbildung 4.8.5: Partikelgröße (PCS) der Dispersionen nach Herstellung, vor und nach der Autoklavierung sowie nach Lagerung.

Polydispersitätsindex beobachtet (PI 0,13 vor sowie 0,07 nach Autoklavierung). In der mit Polyvinylalkohol stabilisierten Dispersion wurde keine Veränderung des Polydispersitätsindex beobachtet (PI 0,14 vor und 0,15 nach der Autoklavierung). Über den weiteren Beobachtungszeitraum von zwei Monaten kam es zu keiner weiteren deutlichen Veränderung der mittleren Partikelgrößen (PCS) in den Dispersionen (Abb. 4.8.5). Lichtmikroskopisch wurden keine Unterschiede zwischen den autoklavierten und nicht autoklavierten Dispersionen beobachtet.

Die mit Poloxamer sowie Poloxamin stabilisierten Dispersionen zeigten ein geringfügig verändertes Phasenverhalten nach der Autoklavierung (Abb. 4.8.6). Die Phasenübergänge waren schärfer und der Kristallisationspeak geringfügig zu höheren Temperaturen verschoben. Des Weiteren war in der mit Poloxamin stabilisierten Dispersion der

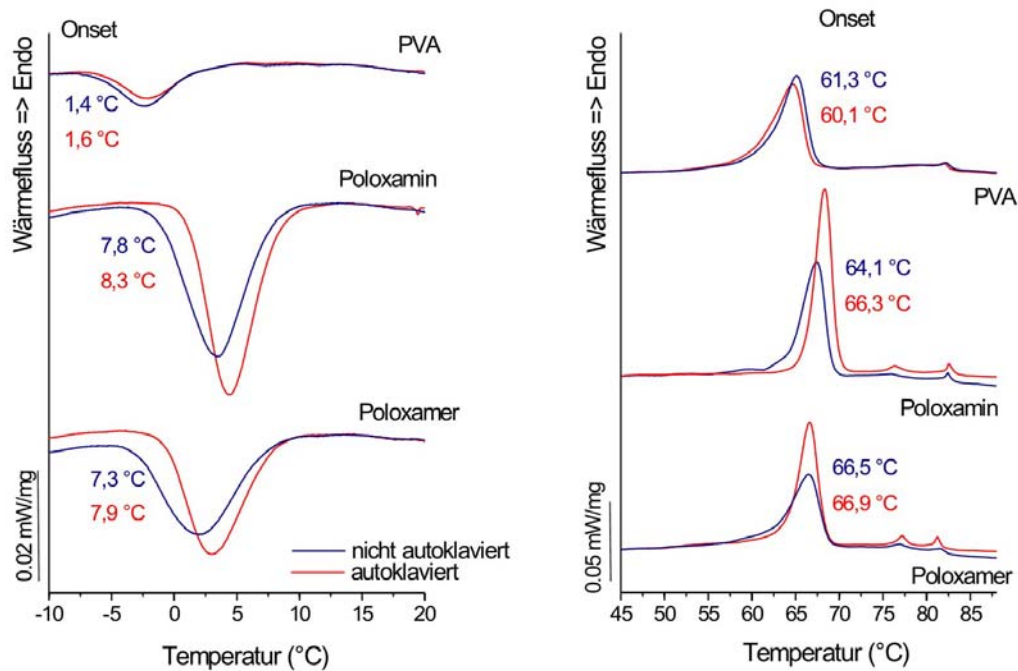


Abbildung 4.8.6: DSC-Kühl- (links) und anschließende Heizkurven (rechts, 5 °C/min) der autoklavierten (orange) und nicht autoklavierten (blau) Dispersionen.

Schmelzpeak zu leicht höheren Temperaturen verschoben. Die mit PVA stabilisierte Dispersion zeigte im Gegensatz dazu keine auffälligen Veränderungen im Phasenverhalten. Die polymerstabilisierten Nanopartikel wiesen praktisch keine Ladung auf. Durch die Autoklavierung wurde das Zetapotential der Dispersionen nicht verändert. Die gemessenen Zetapotentiale der polymerstabilisierten Dispersionen lagen zwischen -2 und -4 mV vor und nach der Autoklavierung. Auch die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab keine deutlichen Veränderungen im Vergleich zu den nicht autoklavierten Dispersionen.

4.8.3 Zusammenfassung und Diskussion

Kolloidale Cholesterylmyristat-Dispersionen, die mit Phospholipid/Gallensalz, Polyvinylalkohol, Poloxamer sowie Poloxamin stabilisiert wurden, zeigten nach der Autoklavierung keine Veränderungen ihres makroskopischen Aussehens. Während die Autoklavierung auf die mit Phospholipid/Gallensalz sowie Polyvinylalkohol stabilisierten Systeme keinen Einfluss auf die mittlere Partikelgröße der Dispersionen hatte, wurde in den mit Poloxamer und Poloxamin stabilisierten Dispersionen eine Zunahme der mittleren Partikelgröße um ca. 20 (Poloxamer) bzw. 35 nm (Poloxamin) nach der Autoklavierung beobachtet. Der Polydispersitätsindex war in beiden Systemen nach der Autoklavierung kleiner. Über den weiteren Beobachtungszeitraum von zwei Monaten wurden kein weiteres Partikelgrößenwachstum und keine Veränderungen des makroskopischen Aussehens beobachtet. Auch im Lichtmikroskop wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den

autoklavierten und nicht autoklavierten Dispersionen festgestellt. Es scheint somit nicht zu einer Destabilisierung des kolloidalen Zustandes der Partikel zu kommen. Die größere mittlere Partikelgröße sowie auch die geringeren Polydispersitätsindices nach der Autoklavierung scheinen auf eine Fusion insbesondere sehr kleiner Partikel hinzuweisen. Auf das gleiche Phänomen könnten auch die in den DSC-Untersuchungen beobachteten schärferen Phasenübergänge zurückgeführt werden. Der Trübungspunkt der beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Block-Copolymere ist mit $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ angegeben (Herstellerangabe), so dass das beobachtete Partikelgrößenwachstum bei der Autoklavierung auf eine teilweise Destabilisierung der Dispersion hinweist. Schwarz untersuchte den Einfluss der Autoklavierung bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf die Partikelgrößen von mit Poloxamer stabilisierten Triglycerid-Dispersionen. Während bei der Autoklavierung bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine deutliche Partikelgrößenzunahme beobachtet wurden, führte die Autoklavierung bei $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht zu Instabilitäten [Schwarz 1995]. Die Stabilität kolloidaler, mit Poloxamer stabilisierter Dispersionen scheint des Weiteren vom verwendeten Matrixlipid abzuhängen. Jumaa untersuchte die Stabilität von kolloidalen Emulsionen unterschiedlicher Matrixlipide (Sojabohnenöl, mittelkettige Triglyceride, Tributyrat sowie Rizinusöl und Mischungen) und Stabilisatoren (u.a. Poloxamer 188) bei Autoklavierung und fand eine deutliche Abhängigkeit der physikalischen Stabilität vom verwendeten Matrixlipid [Jumaa und Müller 1998]. So wurde für mit Poloxamer 188 stabilisierte MCT-Emulsionen eine deutliche Partikelgrößenzunahme nach der Autoklavierung beobachtet, während Emulsionen mit einer Rizinusölmatrix bzw. einer gemischten Matrix aus Rizinusöl und MCT bzw. Sojabohnenöl keine Partikelgrößenzunahme aufwiesen [Jumaa und Müller 1998]. Cavalli et al. untersuchten die Stabilität fester, unbeladener und mit Diazepam beladener Lipid-Nanopartikel, die u.a. mit Poloxamer 188 stabilisiert wurden, hinsichtlich ihrer physikalischen Stabilität gegenüber Autoklavierung [Cavalli et al. 1997]. Es wurden unterschiedliche Matrixlipide (Stearin- und Behensäure sowie ein Diglycerid) zur Herstellung der festen Lipid-Nanopartikel mittels eines Mikroemulsionsprozesses verwendet. Auch in dieser Arbeit wurde eine Abhängigkeit der physikalischen Stabilität vom Matrixlipid gefunden. Während die Diglycerid- und Behenat-Nanopartikel keine Partikelgrößenzunahme nach der Autoklavierung zeigten (es kam hier zu einer geringfügigen Erniedrigung der mittleren Partikelgröße), wurde in den Dispersionen, die als Matrixlipid Stearinsäure enthielten, eine deutliche Partikelgrößenzunahme beobachtet (PCS 76 nm vs. 160 nm nach Autoklavierung). Es wurde kein Einfluss der Beladung der Lipid-Partikel mit dem Arzneistoff gefunden, und der Gehalt des Arzneistoffs wurde durch die Autoklavierung nicht verändert [Cavalli et al. 1997].

Die verwendeten Polymere (Poloxamer, Poloxamin, Polyvinylalkohol) führen zu einer sterischen Stabilisierung der kolloidalen Cholesterylmyristat-Partikel. Das Zetapotential dieser Dispersionen ist sehr gering und wurde durch die Autoklavierung praktisch nicht verändert. Für die auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Dispersionen hat das Zetapotential eine große Bedeutung für die Stabilität der Dispersionen. Für die mit Phospholipid/Gallensalz stabilisierten Dispersionen wurden Zetapotentiale von -30 bis -40 mV gemessen, worauf die gute physikalische Stabilität der Dispersionen zurückzuführen ist. Emulsionen, die mit sehr hoch gereinigtem Phosphatidylcholin (> 99%) hergestellt wurden, wiesen nur eine sehr geringe Partikelladung auf. Nach Autoklavierung bzw. längerer thermischer Belastung wurde ein deutlich stärkeres Partikelgrößenwachstum beobachtet im Vergleich zu Emulsionen, die mit einem weniger gereinigten Phosphatidylcholin hergestellt wurden [Yamaguchi et al. 1995a, Chansiri et al. 1999]. Yamaguchi et al. untersuchten auch den Einfluss verschiedener Co-Stabilisatoren (z.B. Ölsäure, Cholesterol und Tween 80) auf das Zetapotential sowie die Stabilität nach Autoklavierung. Nur der Zusatz von Ölsäure führte zu einer Erhöhung des Zetapotentials und der physikalischen Stabilität gegenüber Autoklavierung [Yamaguchi et al. 1995b].

Die chemische Stabilität von kolloidalen, auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Fettemulsionen ist aufgrund ihrer breiten Anwendung für die parenterale Ernährung gut dokumentiert [Boberg und Håkansson 1964, Herman und Groves 1992 und 1993, Wabel 1998, Washington und Davis 1987]. Phospholipide, die für die Stabilisierung kolloidaler Fettemulsionen für die parenterale Ernährung eingesetzt werden, hydrolysieren in wässrigem Medium zu ihren entsprechenden Lyso-Derivaten und freien Fettsäuren. Die Hydrolyse der Phospholipide ist pH-abhängig und wird durch hohe Temperaturen begünstigt [Grit et al. 1989, Herman und Groves 1992]. Der Abbau der Phospholipide hat eine Zunahme des Zetapotentials zur Folge, was sich günstig auf die Stabilität der Dispersionen auswirkt [Washington und Davis 1987, Chansiri et al. 1999]. Im Gegensatz dazu kann eine massive Hydrolyse der Phospholipide aufgrund der hämolytischen Eigenschaften der Lyso-Derivate [Weltzin 1979] zu toxischen Effekten führen. In einer Lagerstudie kommerziell erhältlicher Fett-Emulsionen (Intralipid) über 3 Jahre bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 20 und 40 °C) zeigte insbesondere die bei 40 °C gelagerte Emulsion eine starke Zunahme der freien Fettsäuren sowie eine deutliche Abnahme des pH-Wertes. Im Tierexperiment wurde für diese Emulsion mit zunehmender Lagerungszeit eine steigende Toxizität beobachtet, wobei nach 3jähriger Lagerung keines der Tiere die Infusion überlebte. Im Gegensatz dazu wiesen die bei 4 und 20 °C gelagerten Emulsionen keine toxischen Wirkungen auf [Boberg und Håkansson

1964]. Allerdings könnte die hohe Toxizität dieser Dispersionen auch durch eine physikalische Instabilität (Partikelgrößenwachstum) der Emulsionen bedingt sein. Die Stabilität der Dispersionen hinsichtlich der Partikelgröße wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Neben Veränderungen des Zetapotentials wurde die chemische Stabilität der Phospholipide in kolloidalen Cholesterylmyristat-Dispersionen dünnschichtchromatographisch untersucht. Schon die Schmelzhomogenisation führt zu einer geringfügigen Phospholipid-Hydrolyse, die durch die Autoklavierung forciert wurde. Eine deutliche Hydrolyse mit einer Abnahme des Phosphatidylcholin-Gehalts trat jedoch erst nach länger dauernder Hitzeeinwirkung (48 Stunden Lagerung bei 90 °C) ein. Im Gegensatz dazu war die Hydrolyse in den wässrigen Phospholipid-Dispersionen stärker ausgeprägt. Nach 24stündiger Lagerung bei 80 °C kam es in Abhängigkeit von der Reinheit des Phospholipids zu einer Abnahme des Phosphatidylcholin-Gehalts um mehr als 50% (S100, E80). Für das nicht so hochgereinigte Phospholipid S75 wurde nach 24stündiger Lagerung eine geringere Abnahme des Phosphatidylcholin-Gehalts um ca. 30% beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Phospholipide, die in der Grenzfläche der Lipidpartikel lokalisiert sind, weniger hydrolyseempfindlich sind als solche in liposomalen Bilayern. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Phospholipid-Hydrolyse erscheint eine Lagerung bei 4°C günstiger als eine Lagerung bei 23 °C. So wurden für zwei bei Raumtemperatur gelagerten Dispersionen in der Dünnschichtchromatographie höhere Anteile an Lysophosphatidylcholin beobachtet im Vergleich zu den bei 4 °C gelagerten Fraktionen der Dispersionen. Für smektische Cholesterylmyristat-Partikel ist aufgrund der hohen Kristallisationstendenz phospholipidstabilisierter Dispersionen (Kapitel 4.4) eine Lagerung bei tieferen Temperaturen nicht möglich. Die Kristallisationstendenz der Nanopartikel kann jedoch durch die Veränderung der Matrixzusammensetzung und den Einsatz geeigneter Stabilisatoren verringert werden (Kapitel 4.5 und 4.4).

4.9 Untersuchungen zur in vitro-Zytotoxizität

Neben der physikalischen und chemischen Stabilität ist eine gute Verträglichkeit eines Arzneistoffträgersystems Voraussetzung für seine pharmazeutische Anwendung, wobei sich in Abhängigkeit vom Applikationsort unterschiedliche Anforderungen ergeben. Für eine erste Evaluierung der Verträglichkeit bzw. Toxizität neuer Substanzen sowie Zubereitungen können in vitro-Untersuchungen an Zellkulturmodellen erfolgen. Da die kolloidalen smektischen Nanopartikel insbesondere für eine parenterale Applikation interessant sind, wurde die in vitro-Toxizität ausgewählter Dispersionen im Vergleich zu einer kommerziell erhältlichen Fettemulsion für die parenterale Ernährung (Lipofundin® MCT) untersucht. Es gibt bislang keine allgemeingültige Vorschrift zur Prüfung der in vitro-Toxizität pharmazeutischer Zubereitungen. Vorschriften zur Prüfung von Medizinprodukten bzw. Kunststoffen finden sich in europäischen Normen [DIN EN ISO 10993-1 und 5] bzw. im amerikanischen Arzneibuch [USP 2002].

Die einfachste Untersuchung des Einflusses von Substanzen bzw. Zubereitungen auf Test-Zellen ist die Zählung lebender sowie toter Zellen nach einer bestimmten Einwirkzeit der zu untersuchenden Substanz. Das kann beispielsweise in einer Neubauer-Kammer nach Anfärbung der Zellen mit Trypan-Blau [Lindl 2002] erfolgen. Dieser Farbstoff vermag nur tote Zellen anzufärben, so dass sich die im Lichtmikroskop hell erscheinenden lebenden Zellen gut von den dunkelblau gefärbten toten Zellen unterscheiden. Diese Methode ist jedoch beim manuellen Auszählen der Zellen relativ zeitaufwendig. Des Weiteren sind verschiedene Zytotoxizitäts-Assays kommerziell erhältlich, die auf verschiedenen Wechselwirkungen von Farbstoffen mit Zellen beruhen. In der vorliegenden Arbeit wurden der MTT- und der SRB-Test durchgeführt, wobei ein Maus-Fibroblasten-Zellkulturmodell zur Anwendung kam. Beim MTT-Test [Mosmann 1983] wird dem Medium nach der Inkubation der Zellen mit der entsprechenden Testformulierung eine Lösung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT, Abb. 4.9.1) zugesetzt. Der Farbstoff wird von lebenden Zellen verstoffwechselt, wobei ein blauer Formazon-Farbstoff gebildet wird, dessen Konzentration anschließend photometrisch bestimmt werden kann. Der Test gibt somit eine Aussage zur metabolischen Aktivität der Zellen.

Im Unterschied dazu erlaubt der SRB-Test [Skehan et al. 1990, Papazisis et al. 1997] eine Aussage zur Zahl der lebenden Zellen. Tote Zellen sind nicht adhärent und werden beim Absaugen des Wachstumsmediums entfernt. Die vom Medium sowie von toten Zellen befreiten Zellen werden nach der Abtötung und Fixierung mittels Trichloressigsäure mit der

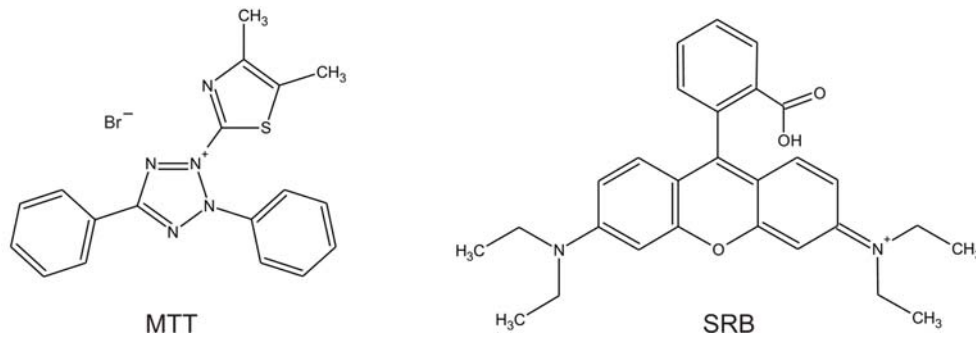


Abbildung 4.9.1: Struktur von 2-[3,4-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) und Sulforhodamin B (SRB).

Sulforhodamin B-Lösung versetzt. Sulforhodamin B (SRB, Abb. 4.9.1) färbt Proteine an. Nach dem Spülen des Zellrasens kann der gebundene Farbstoff gelöst und dessen Konzentration spektrophotometrisch bestimmt werden. Da der Proteingehalt direkt mit der Zellmasse korreliert, kann vom Proteingehalt auf die Zahl der lebenden Zellen geschlossen werden.

4.9.1 Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen zur Auswahl geeigneter Versuchbedingungen wurden mit dem SRB-Test durchgeführt. Die Absorption von Sulforhodamin B ist bis zu Absorptionswerten von ca. 1,8 linear, was einer SRB-Konzentration von ca. 0,001% (m/V) entspricht (Abb. 4.9.2). Bei

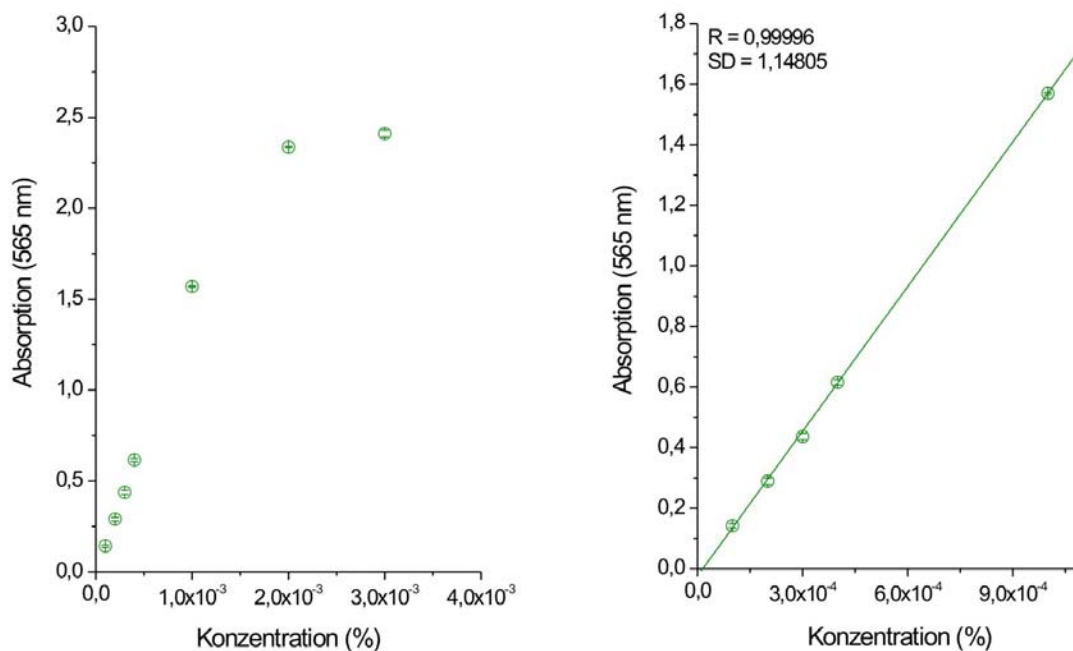


Abbildung 4.9.2: Absorption einer SRB-Verdünnungsreihe. Die Verdünnungsreihe wurde aus der 0,4%igen (m/V) SRB-Lösung hergestellt, die für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendet wurde. Für jede Verdünnung wurde ein dreifacher Ansatz hergestellt.

Konzentrationen $> 0,002\%$ (m/V) SRB wurde kaum noch eine Zunahme der Absorption beobachtet (Abb. 4.9.2).

Bestimmung einer geeigneten Zellzahl

Für die Auswahl einer geeigneten auszusäenden Zellzahl je Vertiefung und Inkubationszeit wurden in 96er Mikrotiterplatten jeweils 2000 bis 7000 Zellen je Vertiefung ausgesät und für unterschiedlich lange Zeiten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Proteingehalt mit dem SRB-Test ermittelt. Bei einer Bebrütungszeit von 48 Stunden lag die Absorption der SRB-Lösung bei ausgesäten Zellzahlen über 3000 Zellen je Vertiefung im nichtlinearen Bereich, woraus ein „Abknicken“ der Konzentrationsreihe und hohe Differenzen zwischen den Einzelmessungen resultierten (Abb. 4.9.3). Bei einer ausgesäten Zellzahl von 7000 Zellen je Vertiefung wurden nach 24stündiger Inkubationszeit Absorptionswerte nahe der Obergrenze des linearen Bereichs gemessen. Für die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde daher eine auszusäende Zellzahl von 5000 Zellen je Vertiefung der Mikrotiterplatten sowie eine Gesamtbebrütungszeit von maximal 24 Stunden gewählt.

Einfluss der Probenzugabe sowie Zytotoxizität des Konservierungsmittels

Da in der vorliegenden Arbeit die Dispersionen gewöhnlich mit 0,01% Thiomersal (m/m, bezogen auf die wässrige Phase) konserviert wurden, wurde die Toxizität der konservierten und isotonierten wässrigen Phase untersucht. Bereits Schöler et al. untersuchten die Zytotoxizität von Thiomersal-Lösungen in Konzentrationen von 0,000075 bis 0,0015% an einer peritonealen Macrophagen-Kultur [Schöler et al. 2000]. Es wurde nur eine geringe

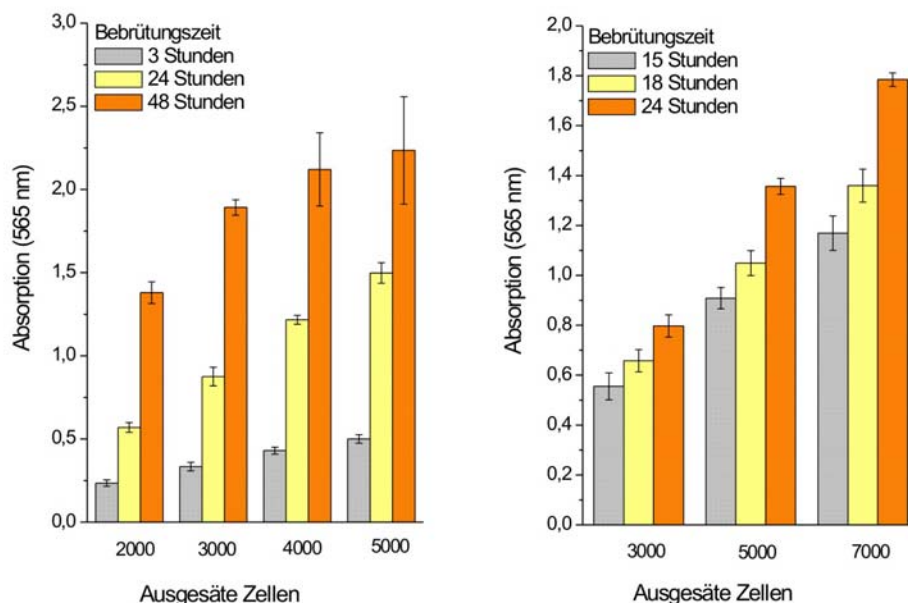


Abbildung 4.9.3: Ergebnisse der Wachstumsreihe (SRB-Test).

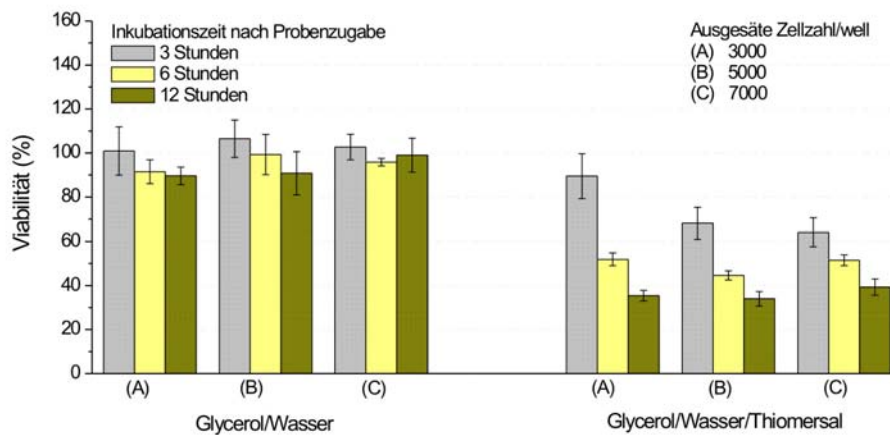


Abbildung 4.9.4: Zytotoxizität der mit Thiomersal konservierten wässrigen Phase im Vergleich zu der nichtkonservierten. Vor Zugabe der Prüflösungen wurden die Zellen für 12 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Toxizität der Thiomersal-Lösungen bei Konzentrationen von 0,000075 und 0,00015% gefunden. Bei höheren Thiomersal-Konzentrationen (0,00075 und 0,0015%) wurde ein deutlicher zytotoxischer Effekt beobachtet.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden nach einer Vorinkubationszeit von 12 Stunden jeweils 50 µl Wachstumsmedium abgenommen und durch die gleiche Menge konservierte wässrige Phase (Thiomersal 0,01%, Glycerol 2,25% m/m) ersetzt, was einer Thiomersal-Konzentration im Medium von 0,0025% entspricht. Zum Vergleich wurden die Zellen mit der gleichen Menge einer nicht konservierten wässrigen Phase (enthält nur 2,25% m/m Glycerol zur Isotonisierung) versetzt. Beide wässrigen Phasen wurden vor den Zellkulturversuchen autoklaviert.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten [Schöler et al. 2000] zeigte die konservierte wässrige Phase eine deutliche zytotoxische Wirkung insbesondere nach längeren Inkubationszeiten von 6 bzw. 12 Stunden (Abb. 4.9.4). Auffällig war auch eine – allerdings geringfügige – Verringerung der Überlebensfähigkeit der Zellen nach längeren Inkubationszeiten durch die Zugabe von nicht konservierter wässriger Phase zum Wachstumsmedium. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Toxizitätsuntersuchungen nicht konservierte Dispersionen hergestellt. Um die Probenmenge möglichst gering zu halten, wurden 10%ige Dispersionen eingesetzt.

4.9.2 Zytotoxizität ausgewählter smektischer Nanopartikel im Vergleich zu Lipofundin® MCT

Die Dispersionen wurden mittels Schmelzhomogenisation mit dem Microfluidizer hergestellt (950-1100 bar, 85 °C, 5 min) und anschließend autoklaviert. Zusammensetzung, mittlere

Tabelle 4.9.1: Zusammensetzung, mittlere Partikelgröße und Osmolalität der Dispersionen nach Herstellung bzw. Autoklavierung

Probe	Zusammen- setzung	nach Homogenisation		nach Autoklavierung			
		Partikelgröße (PCS)		Osmolalität		pH	
		d (nm)	PI	d (nm)	PI	(mOsmol/kg)	
ZK1_RT	10% CM	116	0,12	114	0,12	230	7,0
	6,4% S100						
	1,6% NaGC						
ZK2_RT	10% CN	106	0,13	103	0,13	248	7,0
	6,4% S100						
	1,6% NaGC						
ZK3_RT	10% CM	144	0,11	171	0,07	339	6,0
	8% POL 188						
Lipofundin®	5% Sojabohnenöl			261	0,07	321	6,8
MCT 10% ¹⁾	5% MCT						
	0,8% Ei-Lecithin						

¹⁾ Die Emulsion enthält weiterhin Glycerol 2,5%, Tocopherol und Natriumoleat. Die berechnete Osmolalität ist mit 345 mOsmol/l angegeben. Chargenbezeichnung: 3101A182.

Partikelgrößen sowie Osmolalitäten nach Herstellung bzw. Autoklavierung der Dispersionen sind in Tabelle 4.9.1 aufgeführt. Die Dispersionen wurden ohne weitere Aufreinigung (wie beispielsweise Abtrennung von überschüssigem Stabilisator) verwendet. Da auch die unkonservierte wässrige Phase eine Auswirkung auf die Überlebensfähigkeit der Zellen hatte, wurde bei jedem Versuch ein Teil der Zellen mit der unkonservierten wässrigen Phase (2.25% Glycerol w/w in Wasser für Injektionszwecke) versetzt. Es wurden jeweils 20 µl Probe je Vertiefung der Mikrotiterplatte zugegeben. Die Verdünnungen der Dispersionen wurden mit der unkonservierten wässrigen Phase hergestellt.

Nach den Zellkulturversuchen wurden die Original-Dispersionen in der DSC untersucht. In den Dispersionen wurden keine rekristallisierten Cholesterolester-Anteile nachgewiesen.

SRB-Test

Nur die auf der Basis von Phospholipiden stabilisierten Cholesterolester-Dispersionen zeigten in Konzentrationen von 1% (bezogen auf das Wachstumsmedium, V/V) mit zunehmender Inkubationszeit eine geringe Zytotoxizität (Abb. 4.9.5). Die Überlebensrate der Zellen lag nach 12stündiger Inkubation bei ca. 75% (Cholesterylmyristat-Nanopartikel) bzw. 71% (Cholesterylnonanoat-Nanopartikel) im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen), wobei die Unterschiede statistisch signifikant waren (Abb. 4.9.5). Die mit Poloxamer stabilisierte Dispersionen zeigte - wie auch die kommerzielle Fettemulsion - bei einer Konzentration von

1% auch nach 12stündiger Inkubation nur einen sehr geringen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen: die Zell-Viabilität lag bei ca. 94% (Lipofundin 102%) und war statistisch nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (unbehandelte Zellen). Bei niedrigeren Konzentrationen wurde für alle untersuchten Dispersionen kein zytotoxischer Effekt beobachtet.

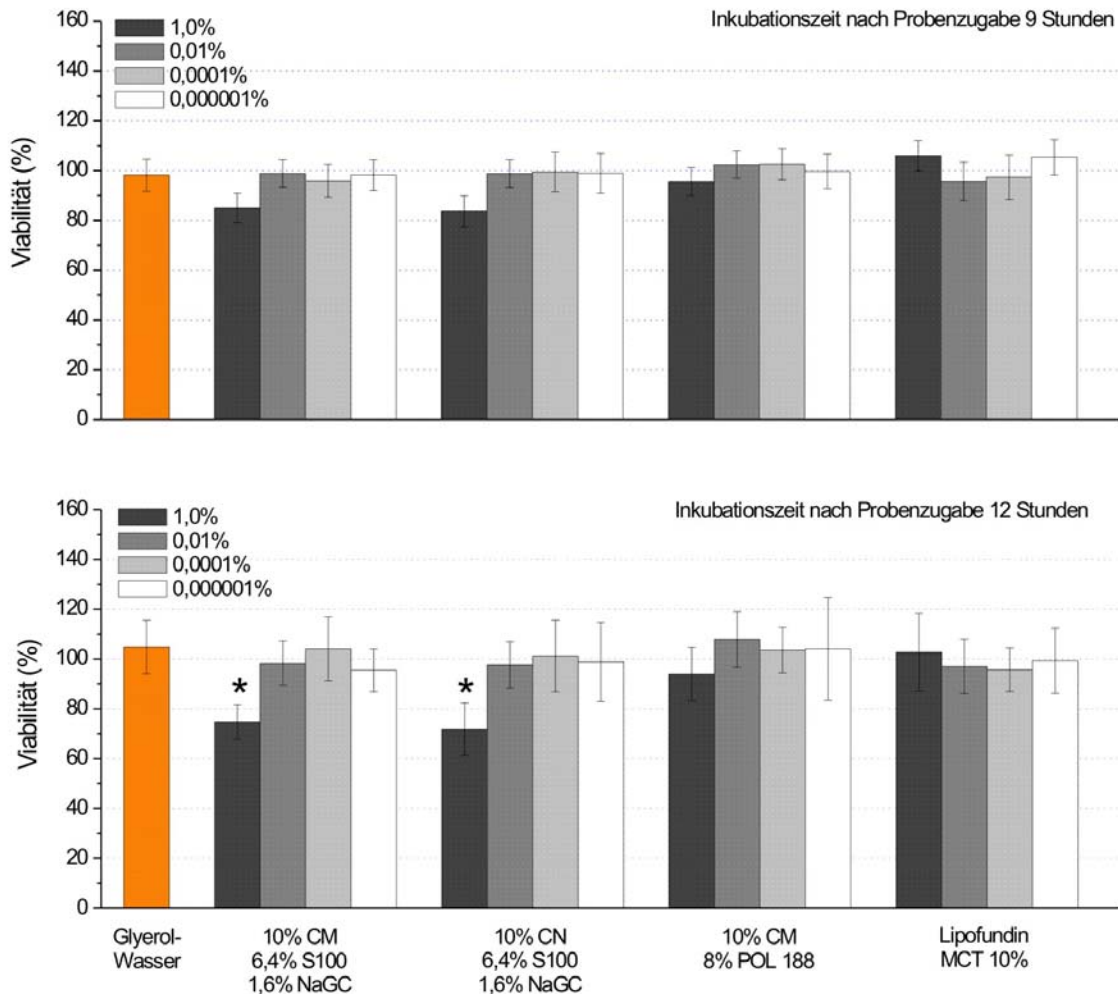


Abbildung 4.9.5: Zytotoxizität der Dispersionen (SRB-Test) nach einer Inkubationszeit der Dispersionen von 9 und 12 Stunden. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentration der Dispersionen im Medium. Die mit einem (*) gekennzeichneten Daten weisen eine signifikante Abweichung von der Kontrolle (unbehandelte Zellen) auf (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%, Anhang A.5).

MTT-Test

Im MTT-Test wurde für alle Dispersionen sowie auch für Lipofundin®MCT bei der höchsten Konzentration eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Toxizität beobachtet (Abb. 4.9.6). Die Zell-Viabilität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen war am niedrigsten bei der phospholipidstabilisierten Cholesterylnonanoat-Dispersion (ca. 17%), gefolgt von den poloxamerstabilisierten (ca. 30%) und phospholipidstabilisierten (ca. 45%) Cholesterylmyristat-Dispersionen. Die mit 1% Lipofundin®MCT behandelten Zellen zeigten eine Überlebensrate von ca. 55%. In geringeren Konzentrationen wiesen die Dispersionen mit Ausnahme der poloxamerstabilisierten Dispersion keine ausgeprägte Zytotoxizität auf (Viabilität zwischen 80 und 100%). Für die poloxamerstabilisierte Dispersion betrug die Überlebensrate der Zellen bei einer Konzentration von 0,01% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nur ca. 65%. Auch die Zugabe der nicht konservierten wässrigen Phase führte im MTT-Test zu einer Abnahme der Überlebensrate der Zellen (Viabilität ca. 85%).

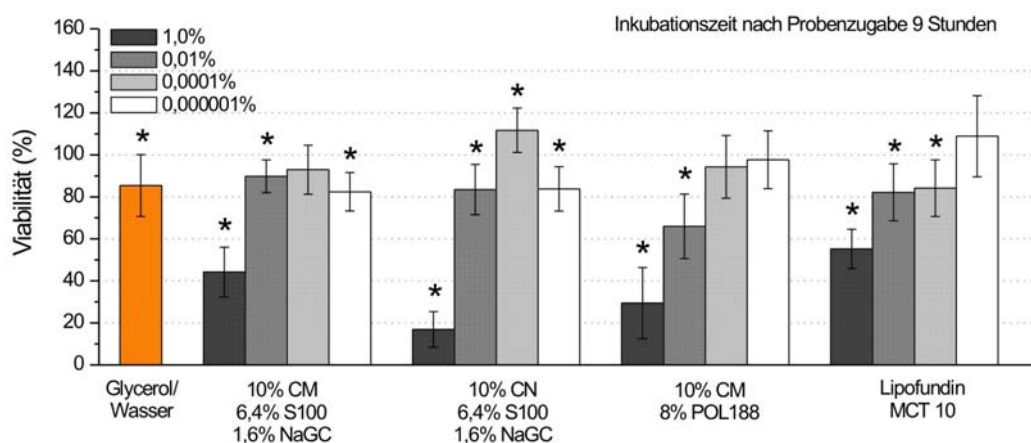


Abbildung 4.9.6: Zytotoxizität der Dispersionen (MTT-Test). 6 Stunden nach Zugabe der Dispersionen wurde die MTT-Lösung hinzupipettiert und die Platten erneut für 3 Stunden inkubiert, so dass sich eine Gesamteinwirkzeit von 9 Stunden ergibt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentration der Dispersionen im Medium. Die mit einem (*) gekennzeichneten Daten weisen eine signifikante Abweichung von der Kontrolle (unbehandelte Zellen) auf (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%, Anhang A.5.)

4.9.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse weisen auf eine nur geringfügig höhere Zytotoxizität der smektischen Nanopartikel im Vergleich zur kommerziell erhältlichen Fettemulsion Lipofundin®MCT hin. Derartige Fettemulsionen werden für die parenterale Ernährung in großen Mengen appliziert, was eine gute Verträglichkeit voraussetzt. Nur bei der höchsten untersuchten Konzentration (1%) wurde für alle Dispersionen (auch für die kommerzielle Fettemulsion) ein zytotoxischer Effekt beobachtet. Die beobachtete höhere Toxizität der untersuchten Dispersionen

smektischer Nanopartikel ist wahrscheinlich auf den höheren Anteil an freien Stabilisatormolekülen zurückzuführen. Lipofundin®MCT enthält eine deutlich geringere Menge an Stabilisatoren im Vergleich zu den Dispersionen smektischer Nanopartikel und weiterhin kein Gallensalz (Tab. 4.9.1). Die Dispersion des nicht physiologischen Cholesterylnonanoats wies im MTT-Assay eine höhere Zytotoxizität im Vergleich zu der Cholesterylmyristat-Dispersion mit dem gleichen Stabilisatorsystem auf. Um mögliche toxische Effekte von Cholesterylnonanoat einschätzen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere im Hinblick auf eine Langzeitwirkung. Da schon der Zusatz einer geringen Menge von Cholesterylnonanoat zum Myristat die Kristallisationstendenz smektischer Nanopartikel stark herabsetzt (Kapitel 4.5), wäre der Einsatz von Cholesterylnonanoat für die Herstellung stabiler smektischer Nanopartikel wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die beiden unterschiedlichen verwendeten Zytotoxizitätstests unterschiedliche Ergebnisse. Der MTT-Test, der auf der metabolischen Aktivität der Zellen beruht, ergab eine höhere Zytotoxizität für alle untersuchten Systeme, insbesondere bei höheren Konzentrationen, da dieser Test Zellschädigungen schon nach geringerer Inkubationszeit aufzeigen kann. Die Mengen des gebildeten Formazon-Farbstoffes waren in der vorliegenden Versuchsdurchführung nur gering und mit niedrigen Absorptionswerten nach der Solubilisierung des Farbstoffs verbunden, so dass eine längere Inkubationszeit der Zellen mit der MTT-Lösung bzw. eine höhere Zellzahl sinnvoll erscheint. Weiterhin ist es nicht auszuschließen, dass zumindest bei den höheren Konzentrationen der Testformulierungen (1%) zu Wechselwirkungen des MTT mit den Emulsionspartikeln kommt, so dass das MTT nicht vollständig für die Zellen verfügbar war und somit eine scheinbar höhere Toxizität der Formulierungen vorgetäuscht wurde. Die mögliche Aufnahme des MTT in die Partikel bzw. eine Adsorption an die Grenzfläche der Partikel wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und bedarf weiterer Evaluierung. Auffällig war weiterhin die Abnahme der Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit der wässrigen Phase (Glycerol/Wasser-Gemisch). Im Unterschied zum MTT-Test ist der SRB-Test relativ preisgünstig und, wie auch die Wachstumsreihen zeigen, gut reproduzierbar. Da in diesem Test alle adhären, lebenden Zellen erfasst werden, können erste Zellschädigungen nicht erfasst werden. In beiden Tests war die Fehlerbreite im Vergleich zu den Wachstumsreihen deutlich größer, was wahrscheinlich auf die intensivere Behandlung der Zellen (Abnahme von Medium, Zugabe der Proben etc.) zurückzuführen ist.

Zur in vitro-Zytotoxizität von festen Lipid-Nanopartikeln, die hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung (u.a. physiologische Lipide wie z.B. Triglyceride) und Herstellungsweise (Schmelzhomogenisation) Ähnlichkeiten mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten kolloidalen Trägersystemen aufweisen, finden sich in der Literatur zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen Zellreihen, wie z.B. Macrophagen [Schöler et al. 2000, 2001, 2002], humane promyelotische Zellen (HL 60) und Granulozyten [Müller et al. 1997a,b] sowie humane Fibroblasten [Olbrich et al. 2002]. Obwohl die Daten nicht direkt miteinander vergleichbar sind, da unterschiedliche Zelllinien und Versuchsbedingungen (Konzentration der Formulierungen im Inkubationsmedium) vorliegen, weisen die Ergebnisse auf eine geringe Zytotoxizität fester Triglycerid-Nanopartikel hin, insbesondere im Vergleich zu Polymernanopartikeln (Polyhexylcyanoacrylat- und Polymethylcyanoacrylat-Partikel, [Müller et al. 1997a, Schöler et al. 2002]). Im Gegensatz dazu zeigten feste Lipid-Nanopartikel mit einer Stearinsäurematrix eine vergleichsweise höhere Toxizität [Schöler et al. 2002].

4.10 Überlegungen zu den Partikelgrößenbestimmungen

Abschließend sollen einige generelle Aspekte der Partikelgrößenbestimmungen kolloidaler Dispersionen anhand ausgewählter Messergebnisse diskutiert werden. Aufgrund der Heterogenität der Dispersionen (unterschiedliche kolloidale Strukturen) sowie der meist breiten Partikelgrößenverteilung, ist eine Messmethode alleine in der Regel nicht ausreichend. Für Partikelgrößenbestimmungen kolloidaler Systeme kommen unterschiedliche Methoden, die auf verschiedenen Messprinzipien basieren, zum Einsatz [Haskell 1998, Washington 1990]. Aufgrund der einfachen Probenpräparation, der geringen benötigten Probenmengen und der relativ schnellen Messung wird häufig die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) verwendet. Mit Hilfe der PCS können auch Partikel im unteren nm-Bereich erfasst werden. Der obere Messbereich wird in der Literatur unterschiedlich angegeben; Partikel $> 1 \mu\text{m}$ können mit diesem Messverfahren in der Regel nicht mehr sicher erfasst werden [Finsy 1994]. Die PCS gibt einen recht robusten intensitätsgewichteten Wert für die mittlere Partikelgröße (z-average) und einen Wert, der ein Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung darstellt (Polydispersitätsindex PI). Bedingt durch das Messverfahren ist die Ermittlung von Partikelgrößenverteilungen aus den PCS-Messwerten insbesondere bei sehr breit verteilten Proben schwierig und das Ergebnis von verschiedenen Annahmen bzw. Auswertungsmodi abhängig [Finsy 1994]. Die Ermittlung der Partikelgrößenverteilung von nicht monomodalen breit verteilten Dispersionen mit Hilfe der PCS erfordert des Weiteren eine ausreichend lange Messzeit. Durch die Kombination der Laserdiffraktometrie mit der sog. PIDS-Technologie wird eine Auflösung bis in den nm-Bereich möglich, so dass mit diesem kombinierten Messverfahren eine Partikelgrößenverteilung kolloidaler Dispersionen erhalten werden kann.

Die mit PCS bzw. LD-PIDS ermittelten mittleren Durchmesser unterschieden sich meist relativ deutlich voneinander (Abb. 4.10.1), sind aber unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Messverfahren in guter Übereinstimmung. Die Unterschiede hinsichtlich der mittleren Partikelgrößen zwischen den PCS- und LD-PIDS-Messungen lassen sich auf die unterschiedlichen physikalischen Messprinzipien und Auswertemodi (PCS: intensitätsgewichteter hydrodynamischer mittlerer Partikeldurchmesser, LD-PIDS: mittlere Durchmesser aus einer Volumenverteilung) beider Methoden zurückführen. In den mit Polymeren stabilisierten Dispersionen wurden in der Regel größere Unterschiede zwischen den mittleren Partikelgrößen von PCS und LD-PIDS gefunden, was wahrscheinlich auf einen scheinbar größeren hydrodynamischen Durchmesser der Partikel durch auf der Oberfläche

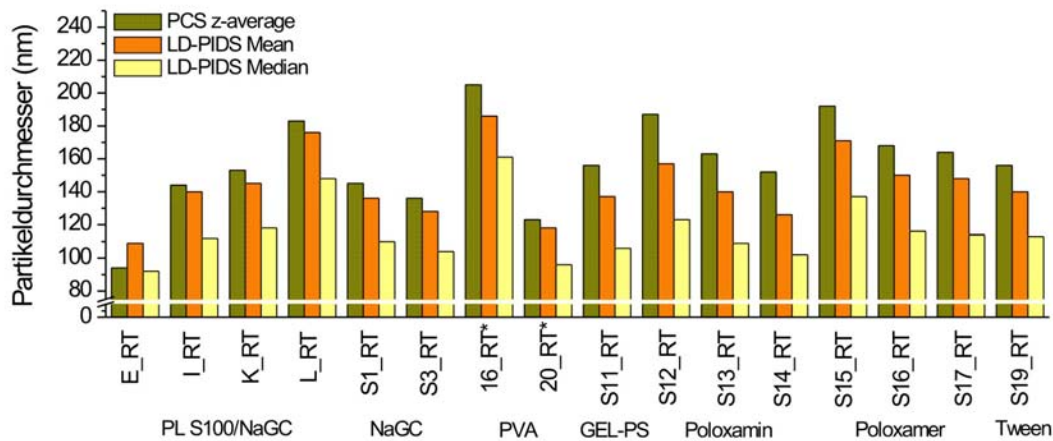


Abbildung 4.10.1: Vergleich der mittleren Partikelgröße der PCS- und LD-PIDS-Messungen.

adsorbierte Polymere oder auch auf die erhöhte Viskosität durch die gelösten Polymere in der Wasserphase zurückgeführt werden kann. Da die Dispersionen vor den Messungen stark verdünnt wurden, ist ein deutlicher Einfluss einer erhöhten Viskosität auf die Ergebnisse der PCS-Messungen jedoch unwahrscheinlich. Wesemeyer [1993] untersuchte den Einfluss adsorbierter Tenside auf die Oberflächeneigenschaften von Latexpartikeln. In der PCS wurde der hydrodynamische Durchmesser der Latexpartikel vor und nach der Adsorption von unterschiedlichen Polymeren gemessen und die Dicke der Adsorbatschichten bestimmt. Für Poloxamin 908, Poloxamer 188 sowie Tween 80 wurden Adsorbatschichten von 8,7, 4,8 bzw. 3,1 nm für Latexpartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 200 nm vor der Polymeradsorption ermittelt [Wesemeyer 1993].

Kristalline Cholesterylmyristat-Nanopartikel (Lagerung im Kühlschrank) zeigten in PCS-Messungen in der Regel höhere z-average-Werte als die bei 23 °C gelagerten smektischen Partikel (Abb. 4.10.2). In den LD-PIDS-Messungen waren die Unterschiede meist nicht so deutlich. Teilweise wurden hier auch kleinere Werte gemessen. Die Unterschiede der PCS z-average-Werte waren in den Dispersionen unterschiedlich stark ausgeprägt. So wurden für Dispersionen, die auf der Basis von Phospholipiden bzw. Tween stabilisiert wurden, meist größere Differenzen in den PCS-Messungen beobachtet (Abb. 4.10.2).

Die höheren mittleren Partikeldurchmesser für die bei 4 °C gelagerten Dispersionen in den PCS-Messungen können auf die mehr oder weniger stark ausgeprägte anisometrische Form kristalliner Cholesterylmyristat-Nanopartikel (Kapitel 4.4) zurückgeführt werden. Durch die veränderten Translations- und insbesondere auch Rotationsbewegung der anisometrischen Partikel wird ein größerer effektiver Partikeldurchmesser in der PCS vorgetäuscht [Finsy 1994]. Im Gegensatz dazu hat die stärker anisometrische Gestalt der kristallinen Partikel auf

das PIDS-Muster eine geringere Auswirkung, da die Messungen nicht zeitkorreliert durchgeführt werden und ein statistisches Mittel der Streumuster der Teilchen erhalten wird. Allerdings werden die Messwerte beider Verfahren durch eine stark anisometrische Partikelform verfälscht [Washington 1992, Finsy 1994]. Trotz der Begrenztheit können mit Hilfe beider Methoden Informationen über die mittlere Partikelgröße sowie die Partikelgrößenverteilung erhalten werden. Insbesondere Veränderungen der mittleren Partikelgröße sowie der Verteilung geben Hinweise auf eine physikalische Instabilität der Dispersionen über den Lagerungszeitraum.

Sowohl PCS als auch LD-PIDS sind Mengenmessverfahren, so dass eine geringe Anzahl größerer Partikel nicht erfasst werden kann [Koster et al. 1996, Driscoll et al. 2001, Washington und Sizer 1992]. Da insbesondere bei Dispersionen, die für eine intravenöse Applikation bestimmt sind, die Anwesenheit größerer Partikel ($> 5 \mu\text{m}$) limitiert werden muss [Floyd und Jain 1996, Yalkowsky et al. 1998], ist eine Charakterisierung mit den beiden oben genannten Messverfahren nicht ausreichend. Zum Nachweis einer geringen Anzahl größerer Partikel eignen sich optische Zählverfahren [Koster et al. 1996, Driscoll et al. 2001, Washington und Sizer 1992], wie z.B. Lichtstreu-Zählverfahren (single-particle optical sensing SPOS) und das Coulter Messprinzip (Electrical Zone Sensing). Aufgrund der relativ hohen Elektrolytmengen, die beim Coulter Messprinzip benötigt werden und die zu

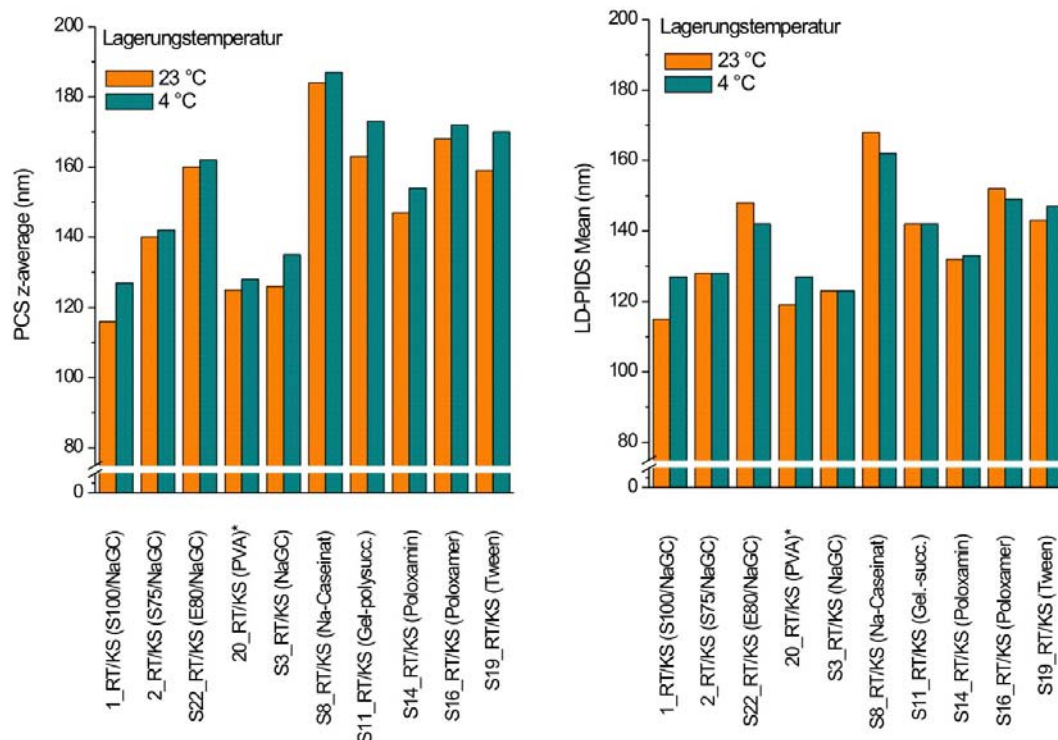


Abbildung 4.10.2: Mittlere Partikelgröße in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur. Links: PCS z-average, rechts: LD-PIDS Mean. Die Messungen erfolgten 2 Monate (1_RT/KS, 2_RT/KS, 20_RT/KS*) bzw. 9 Monate nach Herstellung der Dispersionen.

Veränderungen bzw. Instabilitäten in den Systemen führen können, ist diese Methode vor allem für ladungsstabilisierte Dispersionen nur bedingt geeignet [Müller und Schuhmann 1996, Washington 1992].

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Dispersionen lichtmikroskopisch untersucht, um einen Hinweis auf die Anwesenheit größerer Partikel sowie Partikelaggregate zu erhalten. In vielen Dispersionen wurden Partikel im unteren μm -Bereich (1-3 μm) beobachtet. Partikel mit Durchmessern $> 5 \mu\text{m}$ waren jedoch nur vereinzelt sichtbar. Manchmal wurden in Dispersionen, die mit Phospholipid-Gallensalz-Mischungen stabilisiert wurden, eine relativ hohe Anzahl größerer, meist stäbchenförmiger Partikel (Abb. 4.10.3) beobachtet, was auf den kristallinen Zustand dieser Partikel hinweist. In einer DSC-Messung nach der lichtmikroskopischen Untersuchung einer mit Phospholipid-Gallensalz-Mischung stabilisierten Dispersion wurden jedoch kein kristallines Cholesterylmyristat nachgewiesen. Es könnte sich bei den beobachteten stäbchenförmigen Partikeln um einen Artefakt der Probenpräparation (Zusammenlagerung und Kristallisation der Partikel) handeln, beispielsweise durch elektrostatische Aufladungen des Objektträgers und Deckgläschen, hervorgerufen durch die Reinigung vor der Probenpräparation. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden nicht quantifiziert, so dass keine quantitative Aussage über die Anwesenheit von Partikeln im unteren μm -Bereich getroffen werden kann.

Aufgrund der oben genannten Nachteile erscheint ein Lichtstreu-Zählverfahren (z.B. Accu-Sizer) für die quantitative Bestimmung größerer Partikel im μm -Bereich in den Dispersionen am besten geeignet, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu Verfügung stand.

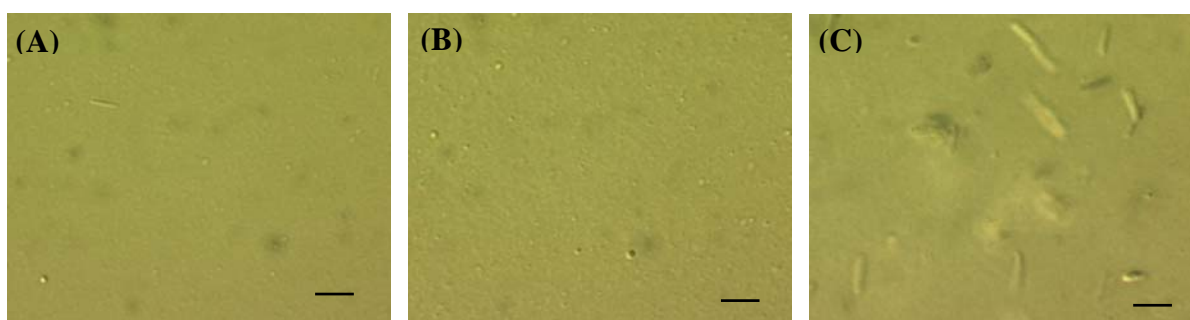


Abbildung 4.10.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Differentieller Interferenzkontrast 5% bzw. 10%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen. (A) S19_RT (5% CM, 4% Tween 80), (B) S17_RT nach Autoklavierung (5% CM, 4% POL 188) und (C) ZK1_RT (10% CM, 6,4% S100, 1,6% NaGC). Die stäbchenförmigen Partikel sowie größeren Aggregate in Bild (C) sind wahrscheinlich auf eine Artefaktbildung zurückzuführen. Balkenlänge 5 μm .

5 ABSCHLUSSDISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung und physikochemischen Charakterisierung eines neuartigen kolloidalen Trägersystems auf der Basis der unterkühlten smektischen Phase von Cholesterolestern. Aufgrund der besonderen Struktur der Mesophasen (Ordnungszustand verbunden mit einer hohen Viskosität sowie Fluidität auf molekularer Ebene) könnten smektische Nanopartikel Vorteile im Vergleich zu konventionellen Fettemulsionen (Stabilität) und festen Lipid-Nanopartikeln (höhere Aufnahmekapazität für Arzneistoffe) aufweisen. Aufgrund ihrer geringen Partikelgröße und unter Voraussetzung eines geeigneten Stabilisatorsystems (Phospholipide, Phospholipid/Gallensalz-Gemische, Poloxamer) erscheinen smektische Nanopartikel für eine intravenöse Applikation geeignet.

Schon reine Cholesterylmyristat-Nanopartikel zeigten trotz der relativ hohen Kristallisationstemperatur (in der Regel deutlich oberhalb von 0°C) eine bemerkenswerte Stabilität der stark unterkühlten smektischen Phase. In optimierten Systemen (Partikelgröße, geeignetes Stabilisatorsystem) blieb der smektische Zustand der Nanopartikel über einen langen Lagerungszeitraum erhalten, wenn die Dispersionen bei Raumtemperatur gelagert wurden (Abb. 4.4.40). Durch die Verwendung von Cholesterolestermischungen als Nanopartikel-Matrix, konnten Dispersionen smektischer Nanopartikel hergestellt werden, die eine höhere Stabilität gegenüber Rekristallisation aufwiesen. Schon die Zumischung relativ geringer Mengen von Cholesteryloleat bzw. -nonanoat – beides Cholesterolester mit einer geringen Kristallisationstendenz – zu Cholesterylmyristat, führte zu smektischen Nanopartikeln, die bei Lagerung bei 23 °C über Lagerung von 18 Monaten nicht rekristallisierten (Kapitel 4.5). Smektische Nanopartikel mit einer gemischten Cholesterylmyristat/-nonanoat-Matrix mit einem hohen Cholesterylnonanoat-Anteil (60% m/m) bzw. mit einer reinen Cholesterylnonanoat-Matrix konnten auch bei 4 °C gelagert werden, ohne dass es zu einer Rekristallisation der Nanopartikel kam (Kapitel 4.5).

Mit Ausnahme einiger weniger Systeme (Stabilisierung mit Gelatine und einem Saccharoseester) zeigten alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Dispersionen eine hervorragende Stabilität hinsichtlich des kolloidalen Zustandes, was wahrscheinlich auf die sehr hohe Viskosität der stark unterkühlten smektischen Phase zurückzuführen ist. Auch längerdauernde Zentrifugation führte nicht zu einer Koaleszenz bzw. Aggregation der Partikel. Der nach Redispergierung der auf der Oberfläche abgeschiedenen, pastenartigen Masse smektischer Nanopartikel bestimmte mittlere Durchmesser (PCS) unterschied sich kaum von dem der Originaldispersion (Kapitel 4.4.1).

Ibuprofen, Miconazol und Etomidat konnten in einer relativ hohen Konzentration (10% m/m bezogen auf die Lipidmatrix) in die Dispersionen eingearbeitet werden, ohne dass es zu einer Destabilisierung der kolloidalen Systeme kam (Kapitel 4.6). Progesteron, das einen deutlich höheren Schmelzpunkt als die anderen untersuchten Arzneistoffe aufweist (Kapitel 3.1, Tab. 3.1.2), konnte jedoch nur in einer Konzentration von 1% bezogen auf das Matrixlipid in die Dispersionen inkorporiert werden. Lichtmikroskopisch wurden keine Arzneistoffpräzipitate beobachtet. Mit Ausnahme der mit Progesteron beladenen Dispersion, zeigte sich der Einbau der Arzneistoffe in die smektischen Nanopartikel deutlich in einem veränderten Phasenverhalten. So waren insbesondere die flüssigkristallinen Phasenübergänge und die Kristallisation zu tieferen Temperaturen verschoben (Abb. 4.6.1, 4.6.2). Im Gegensatz dazu war die Lage des smektischen Röntgenkleinwinkelreflexes unverändert. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass smektische Nanopartikel prinzipiell als Trägersystem für lipophile, schwer wasserlösliche Arzneistoffe dienen können. Inwieweit sie auch hinsichtlich einer Anreicherung des inkorporierten Arzneistoffs im Zielgewebe (drug targeting) geeignet sind, bedarf weiterer Untersuchungen. In dieser Hinsicht erscheinen insbesondere die Verwendung lipophiler Prodrugs, wie sie beispielsweise für proteinfreie LDL-ähnliche Emulsionen verwendet wurden [Rodrigues et al. 2005, Valduga et al. 2003], als auch die Stabilisierung mit Hilfe von Polymeren, die aufgrund einer sterischen Stabilisierung die Zirkulationszeit der Nanopartikel im Blutkreislauf verlängern können [Illum et al. 1989], viel versprechend.

Wässrige Dispersionen smektischer Nanopartikel können durch Hochdruck-Schmelzhomogenisation oder mit Hilfe des Emulsions-Fällungsverfahrens unter Verwendung geeigneter Stabilisatoren hergestellt werden (Kapitel 4.3, Abb. 5.1). Die Hochdruckhomogenisation ist ein etabliertes Verfahren zur Herstellung von kolloidalen Fetteulsionen [Klang und Benita 1998] und sollte für die Herstellung smektischer Nanopartikel ohne größere Probleme in die Großherstellung überführt werden können (scaling up). Bei der Hochdruck-Schmelzhomogenisation erfolgen die Herstellungsschritte bei Temperaturen über der Schmelztemperatur der Matrixlipide, so dass auch Lipide, die bei Raumtemperatur im festen, kristallinen Zustand vorliegen, effizient dispergiert werden können [Müller et al. 2000]. Mittels Hochdruck-Schmelzhomogenisation können Dispersionen smektischer Partikel mit mittleren Durchmessern zwischen 100 und 200 nm hergestellt werden. Da für die Hochdruck-Schmelzhomogenisation keinerlei organische Lösungsmittel notwendig sind, ist dieser Prozess für die Herstellung von kolloidalen Dispersionen für eine parenterale Applikation besonders vorteilhaft. Nachteilig sind die

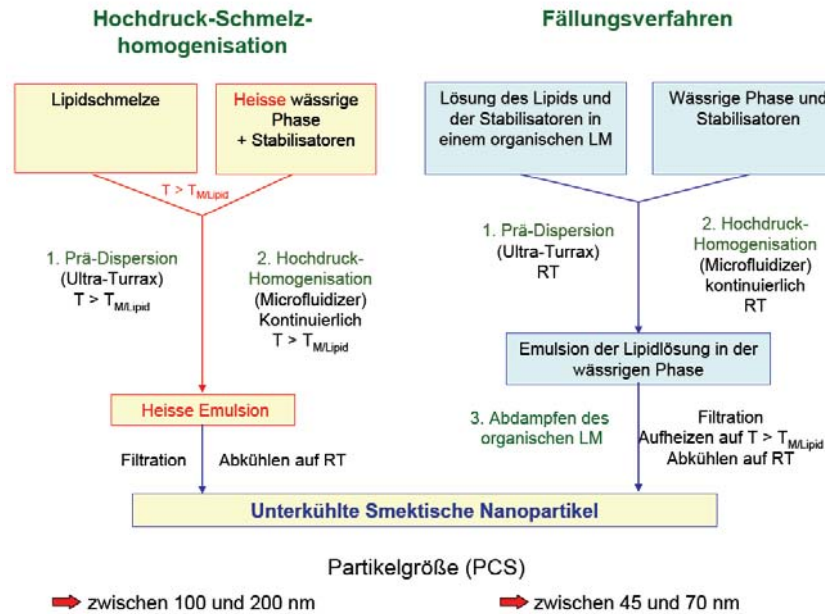


Abbildung. 5.1: Schema der Herstellungsmethoden smektischer Nanopartikel. Abkürzungen: T – Temperatur, $T_{M/Lipid}$ – Schmelztemperatur des Lipids (isotrope Schmelze), RT – Raumtemperatur, LM – Lösungsmittel.

notwendigen hohen Temperaturen, was zu einem zumindest teilweisen Abbau thermolabiler Stoffe führen kann.

Ein alternatives Herstellungsverfahren ist das Emulsions-Fällungsverfahren. Das Matrixlipid sowie lipophile Stabilisatoren und Arzneistoffe werden in einem organischen Lösungsmittel gelöst und diese Lösung mit der wässrigen Phase, die die hydrophilen Stabilisatoren enthält, hochdruckhomogenisiert. Da der gesamte Prozess bei Raum- oder niedrigeren Temperaturen durchgeführt wird, eignet sich dieses Herstellungsverfahren insbesondere auch für die Verarbeitung thermolabiler Stoffe. Nach dem Abdampfen des organischen Lösungsmittels werden die kolloidalen Lipid-Partikel erhalten. Ein nachfolgendes kurzes Aufheizen soll sicherstellen, dass alle Partikel in der smektischen Phase vorliegen. Mit dieser Methode sind Dispersionen mit mittleren Partikelgrößen deutlich unter 100 nm erreichbar. Nachteilig sind jedoch mögliche Reste des organischen Lösungsmittels in den Dispersionen insbesondere im Hinblick auf eine parenterale Applikation.

Für eine parenterale Applikation ist Sterilität ein wichtiges Kriterium. Erste Untersuchungen zeigten, dass Dispersionen unterkühlter smektischer Nanopartikel, die mit Phospholipid/Gallensalz-Gemischen oder mit Polymeren (Poloxamer, Poloxamin, Polyvinylalkohol) stabilisiert wurden, durch Autoklavierung sterilisiert werden können. In den Dispersionen, die mit Poloxamer und Poloxamin stabilisiert wurden, kam es durch Autoklavierung zu einer Zunahme der Partikelgröße. Da jedoch bei weiterer Lagerung kein weiteres Partikelgrößenwachstum beobachtet wurde (Kapitel 4.8., Abb. 4.8.5) und sich die

autoklavierten Dispersionen lichtmikroskopisch nicht deutlich von den nicht autoklavierten unterschieden, scheint es sich nicht um ein generelles Instabilitätsphänomen zu handeln. Neben der Sterilität der Zubereitungen müssen auch die Bestandteile eine gute physiologische Verträglichkeit aufweisen. In ersten Untersuchungen der in vitro-Zytotoxizität wurde für ausgewählte Dispersionen smektischer Nanopartikel (Stabilisierung mit einem Phospholipid/Gallensalz-Gemisch und mit Poloxamer, Cholesterylmyristat- und -nonanoat-Matrix) im Vergleich zu einer kommerziell erhältlichen Fettemulsion (Lipofundin MCT®) keine deutlich höhere Toxizität in einem Maus-Fibroblasten-Zellkultur-Modell beobachtet (Abb. 4.9.5, 4.9.6). Die geringfügig niedrigeren Überlebensraten der Zellen insbesondere nach Inkubation mit der höchsten untersuchten Konzentration der smektischen Nanopartikel im Medium (1%) ist wahrscheinlich zumindest größtenteils auf die im Vergleich zur kommerziellen Formulierung deutlich höhere Stabilisatorkonzentration in den Dispersionen smektischer Nanopartikel zurückzuführen.

Für die Stabilisierung der smektischen Nanopartikel wurden in der vorliegenden Arbeit ganz unterschiedliche grenzflächenaktive Stoffe eingesetzt: gereinigte Phospholipide alleine oder in Kombination mit einem Gallensalz, Gallensalz alleine, Natriumoleat, verschiedene Polymere (Poloxamer, Poloxamin, teilacetylierter Polyvinylalkohol), Tween 80, ein Saccharoseester, Natriumcaseinat, Gelatine und Gelatinepolysuccinat. Mit Ausnahme von Gelatine, die aufgrund der hohen Gelbildungstendenz nur in geringen Konzentrationen verwendet werden konnte, und dem Saccharoseester führte die Verwendung aller anderen Stabilisatoren zu lagerstabilen kolloidalen Dispersionen. Das Stabilisatorsystem beeinflusste in starkem Maße die Rekristallisationstendenz und die Ultrastruktur der smektischen Nanopartikel (Abb. 4.4.38, 4.4.40). In dieser Hinsicht konnten die verwendeten Stabilisatoren (mit Ausnahme des Tween 80, das keiner der Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnte) in zwei Gruppen eingeteilt werden. Einerseits in Stabilisatoren, die – trotz der teilweise relativ hohen Kristallisationstemperaturen – zu Dispersionen smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel führten, die eine sehr geringe Rekristallisationstendenz über den Lagerungszeitraum und eine homogene Ultrastruktur mit zylinderförmigen bis pflastersteinartigen Nanopartikel aufwiesen und andererseits in solche, deren Verwendung in kolloidalen Systemen mit relativ hoher Rekristallisationstendenz und heterogener Ultrastruktur (zylinderförmige und sphärische Partikel) resultierte. Strukturelle Gemeinsamkeit der letztgenannten Stabilisatoren waren Fettsäureketten im Molekül. Aufgrund der Besonderheiten im Kristallisationsverhalten sowie der heterogenen Ultrastruktur wurden insbesondere Dispersionen, die mit Phospholipid/Gallensalz-Gemischen

stabilisiert wurden, intensiv untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Besonderheiten im Kristallisationsverhalten (zweigipfliges Kristallisationsereignis, Abhängigkeit der Kristallisation von der thermischen Vorbehandlung) auf die unterschiedlichen Partikelstrukturen (zylinderförmige und sphärische Partikel), die in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen identifiziert wurden, zurückgeführt werden können (Kapitel 4.4.1). Der genaue Mechanismus sowie die Ursachen, die zur Bildung sowohl sphärischer als auch zylinderförmiger smektischer Nanopartikel führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Auffällig waren weiterhin die teilweise sehr geringen Kristallisationsenthalpien beim Abkühlen in der DSC (5 °C/min), insbesondere in Dispersionen, die auch eine niedrige Rekristallisationstendenz aufwiesen (PVA, Natriumglycocholat, Natriumcaseinat, Abb. 4.4.40). Das Stabilisatorsystem leistet somit nicht nur einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung der Nanopartikel, sondern kann auch den unterkühlten smektischen Zustand der Partikel stabilisieren.

Obwohl die kristallisierten Cholesterolester-Nanopartikel in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail untersucht wurden, könnte die Verwendung von Cholesterolestern wie beispielsweise Cholesterylmyristat auch für die Herstellung fester Lipid-Nanopartikel von Vorteil sein. Einerseits zeigt Cholesterylmyristat kein polymorphes Verhalten und die zu Vergleichszwecken bei 4 °C gelagerten Dispersionen erschienen auch nach längerer Lagerung homogen. Zudem wurde für die im Kühlschrank gelagerten 5%igen Cholesterylmyristat-Dispersionen, die alleine mit gereinigte Soja-Phospholipiden (Lipoid S100 und S75, 3,2%) stabilisiert wurden, auch nach Langzeitlagerung über mehrere Jahre keine Gelbildung beobachtet. Eine alleinige Stabilisierung mit Phospholipiden erwies sich bei der Herstellung fester Triglycerid-Nanopartikel als schwierig, da diese Dispersionen zu einer Gelbildung neigen [Westesen 2000]. Allerdings scheint die Stabilität von Cholesterolester-Dispersionen, die alleine mit Phospholipiden stabilisiert werden, stark von der Konzentration des Matrixlipids wie auch von der des Phospholipids abzuhängen. Eine 10%ige Cholesterolester-Dispersion (8% CM, 2% CN), die mit 5% Phospholipid S100 stabilisiert wurde, zeigte schon kurze Zeit nach Herstellung Anzeichen einer Instabilität (Partikelgrößenwachstum).

Smektische Lipid-Nanopartikel stellen eine interessante Alternative zu anderen kolloidalen lipidbasierten Trägersystemen für lipophile Arzneistoffe dar, insbesondere auch aufgrund ihrer hohen Stabilität hinsichtlich des kolloidalen Zustandes der Partikel. Der smektische Zustand der Nanopartikel war in optimierten Systemen über beachtliche Lagerungszeiten stabil, wenn die Dispersionen bei 23 °C gelagert wurden. Smektische Nanopartikel mit einer gemischten Cholesterolester-Matrix sowie die Stabilisierung mit Polymeren erscheinen im

Hinblick auf die Stabilität des unterkühlten smektischen Zustandes als besonders geeignet. Die Stabilisierung mit Polymeren wie beispielsweise Poloxamer und Tween 80 sollte auch hinsichtlich einer verlängerten Zirkulation im Blutstrom nach intravenöser Gabe von Vorteil sein [Illum et al. 1989]. Es bleibt zu untersuchen, ob smektische Nanopartikel wie proteinfreie LDL-ähnliche Dispersionen auch für den gezielten Transport von Arzneistoffen in Gewebe mit hoher LDL-Rezeptor-Dichte (Tumorgewebe) geeignet sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Dispersionen smektischer Nanopartikel auf der Basis von Cholesterolestern entwickelt und hinsichtlich ihrer Eignung als Arzneistoffträgersystem insbesondere auch für eine intravenöse Applikation untersucht, wobei die physikochemische Charakterisierung dieser Systeme im Mittelpunkt stand.

Viele Cholesterolester sind physiologische Lipide, die in Abhängigkeit von der Temperatur flüssigkristalline Phasen bilden können. Aufgrund der starken Unterkühlungstendenz der smektischen Phase im kolloidalen Zustand können smektische Nanopartikel von Cholesterolestern, die bei Raumtemperatur in der Bulkphase im festen Zustand vorliegen, hergestellt werden. Bei geeigneter Formulierung, Partikelgröße und Lagerung bei 23 °C bleibt der smektische Zustand der Nanopartikel über einen langen Zeitraum erhalten. Der smektische Zustand der Nanopartikel kann durch DSC- und Röntgenuntersuchungen nachgewiesen werden.

Mittels Schmelzhomogenisation können smektische Nanopartikel mit mittleren Partikelgrößen zwischen 100 und 200 nm erhalten werden. Dispersionen mit deutlich kleinerer mittlerer Partikelgröße können mit einem Emulsions-Fällungsverfahren hergestellt werden. Nachteilig sind hier die möglichen verbleibenden Reste des organischen Lösungsmittels, das für die Herstellung benötigt wird. Weiterhin war diese Methode nicht so gut reproduzierbar wie die Schmelzhomogenisation. Da die Herstellung mit dem Fällungsverfahren bei Raum- oder tieferen Temperaturen erfolgt, eignet es sich auch für die Verarbeitung thermolabiler Substanzen.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass Dispersionen smektischer Nanopartikel durch Autoklavierung sterilisiert werden können. Es kam hier zu keiner (Stabilisierung mit einem Phospholipid-Gallensalz-Gemisch und Polyvinylalkohol) bzw. nur zu einer leichten (Stabilisierung mit Poloxamer und Poloxamin) Zunahme der mittleren Partikelgröße der Dispersionen.

Das Stabilisatorsystem beeinflusst in starkem Maße die Partikelgröße sowie die Rekristallisationstendenz smektischer Cholesterylmyristat-Nanopartikel. Mit Ausnahme der Dispersionen, die mit reiner Gelatine und einem Zuckerester stabilisiert wurden, erwiesen sich alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Stabilisatoren als sehr effizient. Alle diese Dispersionen wiesen eine hervorragende Stabilität hinsichtlich des kolloidalen Zustands über lange Lagerungszeiten auf. Die Stabilisierung mit Phospholipiden, Natriumoleat und einem Zuckerfettsäureester führte zu smektischen Nanopartikeln mit einem sehr komplexen

Kristallisationsverhalten sowie einer relativ hohen Rekristallisationsneigung. Das Kristallisationsmuster war abhängig von der Partikelgröße sowie der thermischen Vorbehandlung und veränderte sich mit zunehmender Lagerungszeit der Dispersionen. Diese Besonderheiten sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Strukturen smektischer Nanopartikel (sphärische und zylinderförmige Partikelgestalt), die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurden, zurückzuführen. Im Gegensatz dazu erschienen smektische Nanopartikel, die mit Polymeren sowie Gallensalz alleine stabilisiert wurden, homogener mit pflastersteinartiger bis zylinderförmiger Gestalt. Trotz der oft höheren mittleren Partikelgröße und auch relativ hohen Kristallisationstemperaturen war die Rekristallisationstendenz dieser Nanopartikel bei Lagerung bei 23 °C sehr gering. Die Ursachen für die Ausbildung unterschiedlicher Strukturen smektischer Nanopartikel sowie das komplexe Kristallisationsmuster der beispielsweise mit Phospholipiden stabilisierten Dispersionen sind noch nicht vollständig geklärt und bedürfen weiterer Untersuchung.

Cholesterolestermischungen können als Lipidmatrix für die Herstellung von smektischen Nanopartikeln mit höherer Stabilität gegenüber Rekristallisation eingesetzt werden. Die Zumischung von Cholesteryloleat bzw. -nonanoat (beide Ester kristallisieren nicht im kolloidalen Zustand) zu Cholesterylmyristat bzw. -palmitat führte zu smektischen Nanopartikeln, die bei Lagerung über 18 Monate bei 23 °C nicht kristallisierten. Allerdings kam es bei Lagerung der Dispersionen bei 4 °C in den meisten Dispersionen zu einer zumindest teilweisen Rekristallisation.

Ibuprofen, Etomidat und Miconazol konnten durch gemeinsames Aufschmelzen mit dem Matrixlipid in hoher Konzentration (10% m/m bezogen auf das Matrixlipid) in die Dispersionen eingearbeitet werden. Das höherschmelzende Progesteron konnte nur in einer Konzentration von 1% (m/m bezogen auf das Matrixlipid) in die Dispersionen inkorporiert werden. Alle Dispersionen waren stabil über einen Lagerungszeitraum von 12 Monaten. Mit Ausnahme von Progesteron beeinflussten alle Modellarzneistoffe deutlich das Phasenverhalten des Matrixlipids.

Erste Untersuchungen der in vitro-Zytotoxizität an einem Maus-Fibroblasten Modell weisen auf eine gute Verträglichkeit smektischer Nanopartikel hin. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eventuelle toxische Effekte von Cholesterylnonanoat (dem einzigen nicht-physiologischen Cholesterolester der vorliegenden Arbeit) abzuschätzen. Aufgrund seiner sehr geringen Kristallisationsneigung erscheint dieser Cholesterolester besonders vielversprechend als Additiv zu anderen Cholesterolestern – wie beispielsweise Cholesterylmyristat – oder als Matrixlipid allein.

LITERATURVERZEICHNIS

Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci* 92:1343-1355 (2003).

Ades A., Carvalho J.P., Graziani S.R., Amancio R.F., Souen J.S., Pinotti J.A., Maranhão R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol* 82:84-87 (2001).

Alexandridis P., Hatton T.A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces : thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Coll Surf A* 96:1-46 (1995).

Allémann E., Gurny R., Doelker E. Drug-loaded nanoparticles – preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* 39:173-191 (1993).

Atkinson D., Deckelbaum R.J., Small D.M., Shipley G.G. Structure of human plasma low-density lipoproteins: Molecular organization of the central core. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1042-1046 (1977).

Bach A.C., Férézou J., Frey A. Phospholipid-rich particles in commercial parenteral fat emulsions. An overview. *Prog Lipid Res* 35:133-153 (1996).

Barenholz Y. Liposome application: problems and prospects. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 6:66-77 (2001).

Barnard J.A.W., Lydon J.E. A crystallographic examination of 14 straight chain alkyl esters of cholesterol. *Mol Cryst Liqu Cryst* 26:285-296 (1974).

Barrall E.M., Porter R.S., Johnson J.F. Heats of transition for some cholesteryl esters by differential scanning calorimetry. *J Phys Chem* 71:1224-1228 (1967a).

Barrall E.M., Porter R.S., Johnson J.F. The polymorphism of cholesteryl esters: Differential thermal and microscopic measurements on cholesteryl myristate. *Mol Cryst* 3:103-115 (1967b).

Berneis K.K., Krauss R.M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 43:1363-1379 (2002).

Boberg J., Håkansson I. Physical and biological changes in an artificial fat emulsion during storage. *J Pharm Pharmacol* 16:641-646 (1964).

Bock T., Kleinebudde P., Müller B.W. Manufacture of emulsions by means of high-pressure homogenization: Influence of homogenization parameters, oils and surfactants. In: Müller R.H., Benita S., Böhm B. (Ed.) *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart 1998:201-236.

Brandl M. *Unilamellar liposomal preparations with high active substance content*. United States Patent, US 6,399,094 B1 (2002).

Brandl M., Drechsler M., Bachmann D., Bauer K.H. Morphology of semisolid aqueous phosphatidylcholine dispersions, a freeze fracture electron microscopy study. *Chem Phys Lipids* 87:65-72 (1997).

Brandl M., Drechsler M., Bachmann D., Tardi C., Schmidtgen M., Bauer K.H. Preparation and characterization of semi-solid phospholipid dispersions and dilutions thereof. *Int J Pharm* 170:187-199 (1998).

Bunjes H. *Einflussnahme unterschiedlicher Faktoren auf Struktur und Eigenschaften von Nanopartikeln aus festen Triglyceriden*. Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena 1998.

Bunjes H., Koch M.H.J. Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphism in lipid nanoparticles. *J Contr Rel* 107:229-243 (2005).

Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir* 16:5234-5241 (2000).

Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J Pharm Sci* 92:1509-1520 (2003).

Bunjes H., Rades T. Thermotropic liquid crystalline drugs. *J Pharm Pharmacol* 57:807-816 (2005).

Bunjes H., Siekmann B., Westesen K. Emulsions of supercooled melts – a novel drug delivery system. In: Benita S. (Ed.) *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. Harwood Academic Publ., Amsterdam 1998:175-204.

Bunjes H., Westesen K. Influence of colloidal state on physical properties of solid fats. In: Garti N., Sato K. (Ed.) *Crystallization processes in fats and lipid systems*. Marcel Dekker, New York 2001:457-483.

Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm* 129:159-173 (1996).

Campbell R.B., Balasubramanian S.V., Straubinger R.M. Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of paclitaxel-containing liposomes. *J Pharm Sci* 90:1091-1105 (2001).

Carpentier Y.A., Dupont I.E. Advances in intravenous lipid emulsions. *World J Surg* 24:1493-1497 (2000).

Carroll R.M., Rudel L.L. Evaluation of a high-performance liquid chromatography method for isolation and quantitation of cholesterol and cholesteryl esters. *J Lipid Res* 22:359-363 (1981).

Cavalli R., Caputo O., Carlotti M.E., Trotta M., Scarnecchia C., Gasco M.R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 148:47-54 (1997).

Cavalli R., Caputo O., Gasco M.R. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J Pharm Sci* 10:305-309 (2000).

Cavalli R., Caputo O., Gasco M.R. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *Int J Pharm* 89:R9-R12 (1993).

Cavalli R., Morel S., Gasco M.R., Chetoni P., Saettone M.F. Preparation and evaluation in-vitro of colloidal lipospheres containing pilocarpine as ion-pair. *Int J Pharm* 117:243-246 (1995).

Chandrasekhar S., Ranganath G.S. Discotic liquid crystals. *Rep Prog Phys* 53:57-84 (1990).

Chansiri G., Lyons R.T., Patel M.V., Hem S.L. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *J Pharm Sci* 88:454-458 (1999).

- Chapman D. The polymorphism of glycerides. *Chem Rev.* 62:433-456 (1962).
- Christie W.W. *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. Oily Press, Bridgwater 2003.
- Constantinides P.P., Lambert K.J., Tustian A.K., Schneider B., Lalji S., Ma W., Wentzel B., Kessler D., Worah D., Quay S.C. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm Res* 17:175-182 (2000).
- Coupland J.N. Crystallization in emulsions. *Curr Opin Colloid Interf Sci* 7:445-450 (2002).
- Craven B.M., DeTitta G.T. Cholesteryl myristate: Structures of the crystalline solid and mesophases. *J Chem Soc Perkin-Trans 2* 7:814-822 (1976).
- Crommelin D.J.A., Hennink W.E., Storm G. Drug Targeting Systems: Fundamentals and applications to parenteral drug delivery. In: Hillery A.M., Lloyd A.W., Swarbrick J (Ed.) *Drug Delivery and Targeting*. Taylor & Francis, London und New York 2001.
- Davis G.J., Porter R.S., Barrall E.M. Evaluation of thermal transitions in some cholesteryl esters of saturated aliphatic acids. *Mol Cryst Liq Cryst* 10:1-19 (1970).
- Davis. S.S. Phospholipid stabilized emulsions for parenteral nutrition and drug delivery. In: Hanin I., Pepeu G. (Ed.) *Phospholipids: Biochemical, pharmaceutical, and analytical considerations*. Plenum Press, New York 1990:69-82.
- Deckelbaum R.J., Shipley G.G., Small D.M. Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. *J Biol Chem* 252:744-754 (1977).
- Dickinson E. Proteins at interfaces and in emulsions: Stability, rheology and interactions. *J Chem Soc Faraday Trans* 94:1657-1669 (1998).
- Dierking I. Ferroelektrische Flüssigkristalle – Binär schaltbare Flüssigkristalle eignen sich für schnellere Displays. *Phys Blätter* 56:53-56 (2000).
- DIN 53 765. *Prüfung von Kunststoffen und Elastomeren. Thermische Analyse. Dynamische Differenzkalorimetrie (DDK)*. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin 1994.
- DIN 58 950-1. *Dampf-Sterilisatoren für pharmazeutische Sterilisiergüter. Teil 1: Begriffe*. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin 1995.
- DIN 58 950-6. *Dampf-Sterilisatoren für pharmazeutische Sterilisiergüter. Teil 6: Betrieb*. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin 1992.
- DIN EN ISO 10993-1. *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Teil 1: Beurteilung und Prüfungen*. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin 2003.
- DIN EN ISO 10993-5. *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Teil 5: Prüfungen auf in vitro-Zytotoxizität*. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin 1999.
- Dörfler H.D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme. Physik und Chemie*. Springer-Verlag, Berlin 2002:405-468.
- Dorlhiac-Llacer P.E., Marquezini M.V., Toffoletto O., Carneiro R.C.C., Maranhão R.C., Chamone D.A.F. In vitro cytotoxicity of the LDE:daunorubicin complex in acute myelogenous leukaemia blast cells. *Braz J Med Biol Res* 34:1257-1263 (2001).

Dorset D.L. Cholesteryl esters of saturated fatty acids: Cosolubility and fractionation of binary mixtures. *J Lipid Res* 28:993-1005 (1987).

Driscoll D.F., Etzler F., Barber T.A., Nehne J., Niemann W., Bristrian B.R. Physicochemical assessments of parenteral lipid emulsions: light obscuration versus laser diffraction. *Int J Pharm* 219:21-37 (2001).

Edwards K., Silvander M., Karlsson G. Aggregate structure in dilute aqueous dispersions of oleic acid/sodium oleate and oleic acid/sodium oleate/egg phosphatidylcholine. *Langmuir* 11:2429-2434 (1995).

Europäisches Arzneibuch (Ph.Eur.) 4. Ausgabe.

Evans D.F., Wennerström H. *The colloidal domain. Where physics, chemistry, biology, and technology meet.* Wiley-VCH, New York 1999.

Férézou J., Gulik A., Domingo N., Milliat F., Dedieu J.C., Dunel-Erb S., Chevalier C., Bach A.C. Intralipid 10%: Physicochemical characterization. *Nutrition* 17:930-933 (2001).

Finsy R. Particle sizing by quasi-elastic light scattering. *Adv Colloid Interface Sci* 52:79-143 (1994).

Firestone R.A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. *Bioconj Chem* 5:105-113 (1994).

Floyd A.G., Jain S. Injectable emulsions and suspensions. In: Lieberman H.A. (Ed.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Volume 2.* Marcel Dekker, New York 1996:261-318.

Gainsford S., Beezer A.E., Mitchell J.C., Bell P.C., Fakorede F., Finnie J.K., Williams S.J. Temperature induced aggregation in aqueous solution of a series of PEO-PPO-PEO copolymers. *Int J Pharm* 174:39-46 (1998).

Galanti A.V., Porter R.S. Thermal transitions and phase relationships for binary mixtures of cholesteryl esters. *J Phys Chem* 76:3089-3093 (1972).

Garti N., Yano J. The roles of emulsifiers in fat crystallization. In: Garti N., Sato K. (Ed.) *Crystallization processes in fats and lipid systems.* Marcel Dekker, New York 2001:211-250.

Gasco M.R. *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.* United States Patent, US 5,250,236 (1993).

Gasco M.R., Trotta M. Nanoparticles from microemulsions. *Int J Pharm* 29:267-268 (1986).

Gerke A., Westesen K., Koch M.H.J. Physicochemical characterization of protein-free low density lipoprotein models and influence of drug loading. *Pharm Res* 13:44-51 (1996).

Ginsburg G.S., Atkinson D., Small D.M. Physical properties of cholesteryl esters. *Prog Lipid Res* 23:135-167 (1984).

Ginsburg G.S., Small D.M., Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters: Protein-free models of low density lipoproteins. *J Biol Chem* 257:8216-8227 (1982).

Gouin S., Zhu X.X.. Fluorescence and NMR studies of the effect of a bile acid dimer on the micellization of bile salts. *Langmuir* 14:4025-4029 (1998).

Grit M., deSmidt J.H., Struijke A., Crommelin D.J.A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Int J Pharm* 50:1-6 (1989).

Guerina N.G., Craven B.M. Crystal structure of cholesteryl nonanoate. *J Chem Soc-Perkin Trans 2* 10:1414-1419 (1979).

Güthlein F., Burger A.M., Brandl M., Fiebig H.H., Schubert R., Unger C., Massing U. Pharmacokinetics and antitumor activity of vincristine entrapped in vesicular phospholipid gels. *Anti-Cancer Drugs* 13:797-805 (2002).

Hamada Y., Kobayashi I., Nakajima M., Sato K. Optical and interfacial tension study of crystallization of n-alkane in oil-in-water emulsions using monodispersed droplets. *Cryst Growth Des* 2:579-584 (2002).

Hammer G. *Untersuchungen zu Struktur und Eigenschaften von Ubidecarenon-Nanodispersionen*. Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2002.

Handbook of Pharmaceutical Excipients. Wade A., Weller P. (Ed.), Pharm. Press, London 1994.

Haskell R.J. Characterization of submicron systems via optical methods. *J Pharm Sci* 87:125-129 (1998).

Hecht E, Hoffmann H. Kinetic and calorimetric investigations on micelle formation of block copolymers of the poloxamer type. *Coll Surf A* 96:181-197 (1995).

Herman C.J., Groves M.J. Hydrolysis kinetics of phospholipids in thermally stressed intravenous lipid emulsion formulations. *J Pharm Pharmacol* 44:539-542 (1992).

Herman C.J., Groves M.J. The influence of free fatty acid formation on the pH of phospholipid-stabilized triglyceride emulsions. *Pharm Res* 10:774-776 (1993).

Hevonoja T., Pentikäinen M.O., Hyvönen M.T., Kovanen P.T., Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *BBA* 1488:189-210 (2000).

Hoerr C.W., Paulicka F.R. The role of X-ray diffraction in studies of the crystallography of monoacid saturated triglycerides. *J Am Oil Chem Soc* 45:793-797 (1968).

Höhne G.W.H., Hemminger W.F., Flammersheim H.J. *Differential Scanning Calorimetry*. Springer 2003.

Hosokawa T., Yamauchi M., Yamamoto Y., Iwata K., Nakamura A., Kato Y. Evaluation of the carrier potential for the lipid dispersion system with lipophilic compound. *Biol Pharm Bull* 26:994-999 (2003).

Hungria V.T.M., Latrilha M.C., Rodrigues D.G., Bydlowski S.P., Chiattoni C.S., Maranhão R.C. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 53:51-60 (2004).

Illing A., Unruh T., Koch M.H.J. Investigation on particle self-assembly in solid lipid-based colloidal drug carrier systems. *Pharm Res* 21:592-597 (2004).

Illum L., West P., Washington C., Davis S.S. The effect of stabilizing agents on the organ distribution of lipid emulsions. *Int J Pharm* 54:41-49 (1989).

Jahnke S. The theory of high-pressure homogenization. In: Müller R.H., Benita S., Böhm B.H.L. (Ed.) *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*. Scientific Publ., Stuttgart 1998:177-200.

Janiak M.J., Small D.M., Shipley G.G. Interactions of cholesterol esters with phospholipids: cholesteryl myristate and dimyristoyl lecithin. *J Lipid Res* 20:183-199 (1979).

Jenning V., Schäfer-Korting M., Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Contr Rel* 66:115-126 (2000).

Jores K., Mehnert W., Drechsler M., Bunjes H., Johann C., Mäder K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Contr Rel* 95:217-227 (2004).

Jores K., Mehnert W., Mäder K. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: A nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharm Res* 20:1274-1283 (2003).

Jumaa M., Müller B.W. The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant. *Int J Pharm* 174:29-37 (1998).

Kaiser N., Kimpfler A., Massing U., Burger A.M., Fiebig H.H., Brandl M., Schubert R. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. *Int J Pharm* 256:123-131 (2003).

Kelker H., Hatz R. *Handbook of liquid crystals*. Verlag Chemie Weinheim, 1980.

Klang S., Benita S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: Benia S. (Ed.) *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, Harwood academic publishers, Amsterdam 1998:119-152.

Koch M.H.J., Bordas J. X-ray diffraction and scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nucl Instrum and Methods* 208:461-469 (1983).

Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. PRIMUS: A windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 36:1277-1282 (2003).

Koster V.S., Kuks P.F.M., Lange R., Talsma H. Particle size in parenteral fat emulsions, what are the true limitations? *Int J Pharm* 134:235-238 (1996).

Kraack H., Sirota E.B., Deutsch M. Measurements of homogeneous nucleation in normal-alkanes. *J Chem Phys* 112:6873-6885 (2000).

Krauss R.M., Burke D.J. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 23:97-104 (1982).

Kreuter J. Drug targeting with nanoparticles. *Eur J Drug Metabol Pharmacokin* 3:253-256 (1994).

Kroon P.A. The order-disorder transition of the core cholesteryl esters of human plasma low density lipoprotein. *J Biol Chem* 256:5332-5339 (1981).

Kroon P.A., Krieger M. The mobility of cholesteryl esters in native and reconstituted low density lipoprotein as monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 256:5340-5344 (1981).

Kuchinskiene Z., Carlson L.A. Composition, concentration, and size of low density lipoproteins and of subfractions of very low density lipoproteins from serum of normal men and women. *J Lipid Res* 23:762-769 (1982).

Kumar S. *Liquid Crystals*. Cambridge University Press, 2001.

Lauf U. *DMPC-Nanotubes – Untersuchungen einer neuartigen Vesikelstruktur in Dispersionen aus 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin*. Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena 2003.

Lauf U., Fahr A., Westesen K., Ulrich A.S. Novel lipid nanotubes in dispersions of DMPC. *Chem Phys Chem* 5:1246-1249 (2004).

Lidgate D.M., Trattner T., Shultz R.M., Maskiewicz R. Sterile Filtration of a parenteral emulsion. *Pharm Res* 9:860-863 (1992).

Liu F., Liu D. Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. *Pharm Res* 12:1060-1064 (1995).

Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin 2003.

Lucey J.A., Srinivasan M., Singh H., Munro P.A. Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size-exclusion chromatography. *J Agric Food Chem* 48:1610-1616 (2000).

Lundberg B. Preparation of drug-low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. *Cancer Res* 47:4105-4108 (1987).

Lundberg B.B. Evaluation of methods for complexing prednimustine to low density lipoprotein. *Int J Pharm* 99:275-283 (1993).

Madhusudana N.V. Recent advances in thermotropic liquid crystals. *Curr Sci* 80:1018-1025 (2001).

Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor selective macromolecular drug targeting. *Advan Enzyme Regul* 41:189-207 (2001).

Magenheim B., Levy M.Y., Benita S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers – ultrafiltration technique at low pressure. *Int J Pharm* 94:115-123 (1993).

Malmsten M. Liquid crystalline phases. In: Malmsten M. *Surfactants and polymers in drug delivery*. Marcel Dekker, New York 2002:51-86.

Maranhão R.C., Garicochea B., Silva E.L., Dorlhiac-Llacer P., Cadena S.M.S., Coelho I.J.C., Meneghetti J.C., Pileggi F.J.C., Chamone D.A.F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukaemia. *Cancer Res* 54:4660-4666 (1994).

Maranhão R.C., Graziani S.R., Yamaguchi N., Melo R.F., Latrilha M.C., Rodrigues D.G., Couto R.D., Schreier S., Buzaid A.C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 49:487-498 (2002).

Masquelier M., Vitols S., Peterson C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: in vivo fate of drug-human low-density lipoprotein complexes in mice. *Cancer Res* 46:3842-3847 (1986).

McKeone B.J., Patsch J.R., Pownall H.J. Plasma triglycerides determine low density lipoprotein composition, physical properties, and cell-specific binding in cultured cells. *J Clin Invest* 91:1926-1933 (1993).

McMillan, W.L. X-ray scattering from liquid crystals. I. Cholesteryl nonanoate and myristate. *Phys Rev A* 6:936-947 (1972).

Mehnert W., Mäder K. Solid lipid nanoparticles – Production, characterization and applications. *Adv Drug Delivery Rev* 47:165-196 (2001).

Mehnert W., zur Mühlen A., Dingler A., Weyhers H., Müller R.H. Solid lipid nanoparticles – Ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika. 2. Mitteilung: Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit. *Pharm Ind* 59:511-514 (1997).

Meyer V.R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt am Main 1992.

Miglietta A., Cavalli R., Bocca C., Gabriel L., Gasco M.R. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporationg doxorubicin or paclitaxel. *Int J Pharm* 210:61-67 (2000).

Moog R., Burger A.M., Brandl M., Schüler J., Schubert R., Unger C., Fiebig H.H., Massing U. Change in pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of gemcitabine in human tumor xenografts upon entrapment in vesicular phospholipid gels. *Cancer Chemother Pharmacol* 49:356-366 (2002).

Morera S., Castellote A.I., Jauregui O., Casals I., López-Sabater M.C. Triacylglycerol markers of mature human milk. *Eur J Clin Nutr* 57:1621-1626 (2003).

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55-63 (1983).

Mowiol® Polyvinylalkohol. Hsg. Hoechst AG., Frankfurt am Main 1991.

Mu L., Feng S.S. PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: Effects of the emulsifier and drug loading ratio. *Pharm Res* 20:1864-1872 (2003).

Müller R.H., Dingler A., Weyhers H., zur Mühlen A., Mehnert W. Solid lipid nanoparticles – ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika. 3. Mitteilung: Langzeitstabilität, Gefrier- und Sprühtrocknung, Toxizität, Anwendung in Kosmetika und Pharmazeutika. *Pharm Ind* 59:614-619 (1997d).

Müller R.H., Maassen S., Schwarz C., Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *J Contr Rel* 47:261-269 (1997b).

Müller R.H., Mäder K., Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50:161-177 (2000).

Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 242:121-128 (2002).

- Müller R.H., Rühl D., Runge S., Schulze-Forster K., Mehnert W. Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm Res* 14: 458-462 (1997a).
- Müller R.H., Schuhmann R. *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1996.
- Müller R.H., Weyhers H., zur Mühlen A., Dingler A., Mehnert W. Solid lipid nanoparticles – ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika. 1. Mitteilung: Systemeigenschaften, Herstellung und Scaling-up. *Pharm Ind* 59:423-427 (1997c).
- Müller-Goymann C.C. Liquid crystals in Therapeutics. In: Swarbrick J, Boylan J.C. (Ed.) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, New York 2002:834-853.
- Murtha J.L., Ando H.Y. Synthesis of the cholesteryl ester prodrugs cholesteryl ibuprofen and cholesteryl flufenamate and their formulation into phospholipid microemulsions. *J Pharm Sci* 83:1222-1228 (1994).
- Myrdal P.B., Yalkowsky S.H. Solubilization of drugs in aqueous media. In: Swarbrick J, Boylan J.C. (Ed.) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, New York 2002:2458-2480.
- Naini V., Singh S.K. Homogenization and homogenizers. In: Swarbrick J., Boylan J.C. (Ed.) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, New York 2002:1479-1487.
- Nakano M., Teshigawara T., Sugita A., Leesajakul W., Taniguchi A., Kamo T., Matsuoka H., Handa T. Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/pluronic F127 system. *Langmuir* 18:9283-9288 (2002).
- Nobs L., Buchegger F., Gurny R., Allémann E. Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci* 93:1980-1992 (2004).
- Nuijen B., Bouma M., Schellens J.H.M. Beijnen J.H. Progress in the development of alternative pharmaceutical formulations of taxanes. *Invest New Drugs* 19:143-153 (2001).
- Olbrich C., Müller R.H., Tabatt K., Kayser O., Schulze C., Schade R. Stable biocompatible adjuvants – A new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: A study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *ATLA* 30:443-458 (2002).
- Orlowa E.V., Sherman M.B., Chiu W., Mowri H., Smith L.C., Gotto A.M. Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8420-8425 (1999).
- Owens M.D., Halbert G.W. Production and characterization of protein-free analogues of low density lipoprotein. *Eur J Pharm Biopharm* 41:120-126 (1995).
- Paltauf F., Hermetter A. Phospholipids – natural, semisynthetic, synthetic. In: Hanin I., Pepeu G. (Ed.) *Phospholipids: Biochemical, Pharmaceutical, and Analytical Considerations*. Plenum Press, New York 1990: 1-12.
- Papazisis K.T., Geromichalos G.D., Dimitriadis K.A., Kortsaris A.H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Meth* 208:151-158 (1997).
- Pelzl G., Diele S., Weissflog W. Banana-shaped compounds – A new field of liquid crystals. *Adv Mat* 11:707-724 (1999).

Pharmazeutische Stoffliste. 11. Auflage, Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH, Eschborn/Taunus, 1999.

Povey M.J.W. Crystallization of oil-in-water emulsions. In: Garti N., Sato K. (Ed.) *Crystallization processes in fats and lipids systems*. Marcel Dekker, New York 2001:251-288.

Prankerd R.J., Stella V.J. The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. *J Parenteral Sci Technol* 44:139-149 (1990).

Prassl R., Schuster B., Abuja P.M., Zechner M., Kostner G.M., Lagner P. A comparison of structure and thermal behavior in human plasma lipoprotein(a) and low-density lipoprotein. Calorimetry and small-angle X-ray scattering. *Biochem* 34:3795-3801 (1995).

Pregetter M., Prassl R., Schuster B., Kriechbaum M., Nigon F., Chapman J., Lagner P. Microphase separation in low density lipoproteins. *J Biol Chem* 274:1334-1341 (1999).

PubChem. National Center of Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Rapp G., Gabriel A., Dosi re M., Koch M.H.J. A dual detector single readout system for simultaneous small- (SAXS) and wide-angle X-ray (WAXS) scattering. *Nuc Instrum Meth A* 357:178-182 (1995).

Reisinger R.E., Atkinson D. Phospholipid/cholesteryl ester microemulsions containing unesterified cholesterol: Model systems for low density lipoproteins. *J Lipid Res* 31:849-858 (1990).

Rensen P.C.N., de Vru h R.L.A., Kuiper J., Bijsterbosch M.K., Biessen E.A.L., van Berkel T.J.C. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 47:251-276 (2001).

Rodrigues D.G., Covan C.C., Coradi S.T., Barboza R., Maranhão R.C. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J Pharm Pharmacol* 54:765-772 (2002).

Roheim P.S., Asztalos B.F. Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis. *Clin Chem* 41:147-152 (1995).

Rote Liste 2003: Arzneimittelverzeichnis f r Deutschland, Editio-Cantor-Verlag, Aulendorf 2003.

Rotenberg M., Rubin M., Bor A., Meyuhas D., Talmon Y., Lichtenberg D. Physico-chemical characterization of IntralipidTM emulsions. *Biochim Biophys Acta* 1086:265-272 (1991).

Rudel L.L., Parks J.S., Johnson F.L., Babiak J. Low density lipoproteins in atherosclerosis. *J Lipid Res* 27:465-474 (1986).

Rudling M.J., Collins V.P., Peterson C.O. Delivery of aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. *Cancer Res* 43:4600-4605 (1983).

Ryoto Sugar Esters[ ]. Produktbroschüre des Herstellers (Mitsubishi-Kagaku foods corp.) 2001.

Sakamoto K., Porter R.S., Johnson J.F. The viscosity of mesophases formed by cholesteryl myristate. In: Brown G.H. (Ed.) *Liquid Crystals 2 Part II*. Gordon and Breach Science Publ., New York 1969:237-249.

Sawzik P., Craven B.M. Cholesteryl Esters: Crystal and Mesophase structures. In: Chandrasekhar S. (Ed.) *Liquid Crystals*. Heyden&Son, Philadelphia 1980:171-178.

Schaal G. *Untersuchungen einer Befilmungsmöglichkeit fester Arzneiformen mit modifizierten Triglycerid-Dispersionen*. Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena 2003.

Scherlund M., Brodin A., Malmsten M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. *Int J Pharm* 211:37-49 (2000).

Schöler N., Hahn H., Müller R.H., Liesenfeld O. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm* 231:167-176 (2002).

Schöler N., Olbrich C., Tabatt K., Müller R.H., Hahn H., Liesenfeld O. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm* 221:57-67 (2001).

Schöler N., Zimmermann E., Katzfey U., Hahn H., Müller R.H., Liesenfeld O. Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct or indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages. *Int J Pharm* 196:235-239 (2000).

Schwarz C. *Feste Lipidnanopartikel: Herstellung, Charakterisierung, Arzneistoffinkorporation und –freisetzung, Sterilisation und Lyophilisation*. Dissertation Freie Universität Berlin 1995.

Scott R.R., Tabibi S.E. A practical guide to equipment selection and operating techniques. In: Liebermann H.A. (Ed.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Volume 3*. Marcel Dekker, New York 1998:291-362.

Sharma A., Sharma U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm* 154:123-140 (1997).

Sharma A., Straubinger R.M. Novel taxol formulations: Preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm Res* 11:889-896 (1994).

Shuai X., Merdan T., Schaper A.K., Xi F., Kissel T. Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers. *Bioconj Chem* 15: 441-448 (2004).

Siekmann B. *Untersuchungen zur Herstellung und zum Rekristallisationsverhalten schmelzemulgierter intravenös applizierbarer Glyceridnanopartikel*. Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig 1994.

Siekmann B., Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride-water phases. *Int J Pharm* 244:33-43 (2002).

Siekmann B., Westesen K. Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *Eur J Pharm Biopharm* 43:104-109 (1996).

Siekmann B., Westesen K. Preparation and physicochemical characterization of aqueous dispersions of coenzyme Q₁₀ nanoparticles. *Pharm Res* 12:201-208 (1995).

Sjöström B., Bergenstahl B. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w-emulsions: I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int J Pharm* 84:107-116 (1992).

Sjöström B., Bergenstahl B., Kronberg B. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water soluble drugs by precipitation in o/w-emulsions. II. Influence of the emulsifier, the solvent and the drug substance. *J Pharm Sci* 82:584-589 (1993b).

Sjöström B., Kaplun A., Talmon Y., Cabane B. Structures of nanoparticles prepared from oil-in-water emulsions. *Pharm Res* 12:39-48 (1995).

Sjöström B., Kronberg B., Carlfors J. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water soluble drugs by precipitation in o/w-emulsions. I: Influence of emulsification and surfactant concentration. *J Pharm Sci* 82:579-583 (1993a).

Sjöström B., Westesen K., Bergenstahl B. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions: II. Characterization of cholesteryl acetate particles. *Int J Pharm* 94:89-101 (1993c).

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat Cancer Inst* 82:1107-1112 (1990).

Small D.M. *Handbook of Lipid Research 4, The Physical Chemistry of Lipids – From Alkanes to Phospholipids*. Plenum Press, New York 1986.

Small D.M., Loomis C., Janiak M., Shipley G.G. Liquid crystalline behaviour of biologically important lipids – Polyunsaturated cholesterol esters and phospholipids. In: Johnson J.F. (Ed.) *Liquid Crystals and Ordered Fluids Vol.2*, Plenum Press New York 1974:11-22.

Small D.M., Shipley G.G. Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science* 185:222-229 (1974).

Snow J., Philips M.C. Phase behaviour of cholesteryl ester dispersions which model the inclusions of foam cells. *Biochemistry* 29:2464-2471 (1990).

Snow JW, McCloskey HM, Glick JM, Rothblat GH, Philips MC. Physical state of cholesteryl esters deposited in cultured macrophages. *Biochem* 27:3640-3646 (1988).

Söderlind E., Wollbratt M., von Corswant C. The usefulness of sugar surfactants as solubilizing agents in parenteral formulations. *Int J Pharm* 252:61-71 (2003).

Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Contr Rel* 70:1-20 (2001).

Stevenson C.L., Bennett D.B., Lechuga-Ballesteros D. Pharmaceutical Liquid Crystals: The relevance of partially ordered systems. *J Pharm Sci* 94:1861-1880 (2005).

Szebeni J., Alving C.R., Savay S., Barenholz Y., Prieve A., Danino D., Talmon Y. Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol: possible role in hypersensitivity reactions. *Int Immunopharmacol* 1:721-735 (2001).

Tarr B.D., Sambandan T.G., Yalkowsky S.H. A new parenteral emulsion for the administration of taxol. *Pharm Res* 4:162-165 (1987).

Teerlink T., Scheffer P.G., Bakker S.J.L., Heine R.J. Combined data from LDL composition and size measurement are compatible with a discoid particle shape. *J Lipid Res* 45:954-966 (2004).

Torchilin V., Weissig V. (Ed.). *Liposomes – A Practical Approach*. Oxford University Press, New York 2003.

Trotta M., Debernardi F., Caputo O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 257:153-160 (2003).

Ueno S., Hamada Y., Sato K. Controlling polymorphic crystallization of n-alkane crystals in emulsion droplets through interfacial heterogeneous nucleation. *Cryst Growth Design* 3:935-939 (2003).

Unger K.K. *Handbuch der HPLC, Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker*. GIT Verlag, Darmstadt 1989.

United States Pharmacopoe XXV, 2002.

Unruh T., Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J. Investigations on the melting behaviour of triglyceride nanoparticles. *Colloid Polym Sci* 279:398-403 (2001).

Valduga C.J., Fernandes D.C., Lo Prete A.C., Azevedo C.H.M., Rodrigues D.G., Maranhão R.C. Use of a cholesterol-rich microemulsions that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol* 55:1615-1622 (2003).

van Antwerpen R., Chen G.C., Pullinger C.R., Kane J.P., LaBelle M., Krauss R.M., Luna-Chavez C., Forte T.M., Gilkey J.C. Cryo-electron microscopy of low density lipoprotein and reconstituted discoidal high density lipoprotein: imaging of the apolipoprotein moiety. *J Lipid Res* 38:659-669 (1997).

van Antwerpen R., Gilkey J.C. Cryo-electron microscopy reveals human low density lipoprotein substructure. *J Lipid Res* 35:2223-2231 (1994).

van Antwerpen R., LaBelle M., Navratilova E., Krauss R.M. Structural heterogeneity of apoB-containing serum lipoproteins visualized using cryo-electron microscopy. *J Lipid Res* 40:1827-1836 (1999).

Versluis A.J., Rump E.T., Rensen P.C.N., van Berkel T.J.C., Bijsterbosch M.K. Synthesis of a lipophilic daunorubicin derivate and its incorporation into lipidic carriers developed for LDL receptor-mediated tumor therapy. *Pharm Res* 15:531-537 (1998).

Vogel M.J., Barrall E.M., Mignosa C.P. Polymorphism in cholesteryl esters: Cholesteryl palmitate. *IMB J Res Dev* 15:52-58 (1971).

Wabel C. *Influence of lecithin on structure and stability of parenteral fat emulsions*. Dissertation Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg 1998.

Wang R., Ying F., Lai L. A new atom-additive method for calculating partition coefficients. *J Chem Inf Comput Sci* 37:615-621 (1997).

Washington C. *Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries: theory and practice*. Ellis Horwood, New York 1992.

Washington C. The stability of intravenous fat emulsions in total parenteral nutrition mixtures. *Int J Pharm* 66:1-21 (1990).

Washington C., Davis S.S. Ageing effects in parenteral fat emulsions: the role of fatty acids. *Int J Pharm* 39:33-37 (1987).

Washington C., Davis S.S. The production of parenteral feeding emulsions by Microfluidizer. *Int J Pharm* 44:169-176 (1988).

Washington C., Sizer T. Stability of TPN mixtures compounded from Lipofundin S and Aminoplex amino-acid solutions: Comparison of laser diffraction and Coulter counter droplet size analysis. *Int J Pharm* 83:227-231 (1992).

Weltzien H.U. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 559:259-287 (1979).

Wendorff J.H., Price F.P. The structure of mesophases of cholesteryl esters. *Mol Cryst Liq Cryst* 24:129-144 (1973).

Wesemeyer H. *Mikrokalorimetrische und chromatographische Untersuchungen zur Oberflächenmodifikation von partikulären Arzneistoffträgern durch Tenside*. Dissertation Christian-Albrechts-Universität Kiel 1993.

Westesen K., Bunjes H., Koch M.H.J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Contr Release* 48:223-236 (1997).

Westesen K. Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems – expectations and reality. *Colloid Polym Sci* 278:608-618 (2000).

Westesen K., Drechsler M., Bunjes H. Colloidal dispersions based on solid lipids. In: Dickinson E., Miller R. (Ed.) *Food Colloids – Fundamentals of Formulation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001:103-115.

Westesen K., Gerke A., Koch M.H.J. Characterization of native and drug-loaded human low density lipoproteins. *J Pharm Sci* 84:139-147 (1995).

Westesen K., Siekmann B. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 151:35-45 (1997).

Westesen K., Wehler T. Physicochemical characterization of a model intravenous oil-in-water emulsion. *J Pharm Sci* 81:777-786 (1992).

Wiedmann T.S., Kamel L. Examination of the solubilization of drugs by bile salt micelles. *J Pharm Sci* 91:1743-1764 (2002).

Wörle G., Siekmann B., Bunjes H. Effect of drug loading on the transformation of vesicular into cubic nanoparticles during heat treatment of aqueous monoolein/poloxamer dispersions. *Eur J Pharm Biopharm* (in press, 2006).

Xu R. Improvements in particle size analysis using light scattering. In: Müller R.H., Mehnert W. (Ed.) *Particle and Surface Characterizing Methods*. Scientific Publisher, Stuttgart 1997:27-56.

Yalkowsky S.H., Krzyzaniak J.F., Ward G.H. Formulation-related problems associated with intravenous drug delivery. *J Pharm Sci* 87:787-796 (1998).

Yamaguchi T., Nishizaki K., Itai S., Hayashi H., Ohshima H. Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsions: Determination of hamaker constants and activation energy of coalescence. *Pharm Res* 12: 342-347 (1995a).

Yamaguchi T., Nishizaki K., Itai S., Hayashi H., Ohshima H. Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsions: Influence of cosurfactants on flocculation and coalescence. *Pharm Res* 12:1273-1278 (1995b).

Yao J.K., Rastetter G.M. Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Analyt Biochem* 150:111-116 (1985).

Yokoyama M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J Artif Organs* 8:77-84 (2005).

zur Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* 45:149-155 (1998).

ANHANG

A.1 Zusammensetzung, Herstellungsbedingungen und mittlere Partikelgröße der Dispersionen

Alle Mengenangaben sind m/m-Prozente und beziehen sich auf die gesamte Dispersion im Herstellungsansatz. Die wässrige Phase der Dispersionen enthält, wenn nicht anders angegeben, 0,01% Thiomersal für die Konservierung und 2,25% Glycerol zur Isotonisierung. Die pH-Werte der wässrigen Phasen lagen zwischen 6 und 7 und die Osmolalitäten zwischen 240 und 255 mOsmol/kg.

Dispersionen, die mit einem (*) gekennzeichnet sind, wurden mit einer wahrscheinlich verunreinigten Charge Cholesterylmyristat hergestellt (A.2.1. DSC-Untersuchungen unterschiedlicher Cholesterylmyristat-Chargen).

A.1.1 Einfluss des Herstellungsverfahrens

Schmelzhomogenisation

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisationsbedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung ¹ d (nm)	PI
A_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	10.07.2001	SH, MF 7 min p = 800-1300 bar ² (steigend) T = 50-60 °C ²	185,3 ± 0,5	0,136 ± 0,004
B_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	10.07.2001	SH, MF 7 min p = 1300-800 bar ² (fallend) T = 50-60 °C ²	158,8 ± 0,2	0,136 ± 0,004
C_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	10.07.2001	SH, MF 7 min p = 1200 bar ² T = 60-70 °C ²	129,4 ± 0,2	0,126 ± 0,002
D_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	11.07.2001	SH, MF 7 min p = 800-1300 bar ² T = 85-90 °C	95,5 ± 0,1	0,149 ± 0,003
E_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	11.07.2001	SH, MF 7 min p = 1300-800 bar ² (fallend) T = 85-90 °C	93,8 ± 0,3	0,138 ± 0,002
F_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	11.07.2001	SH, MF 6 min p = 1200 bar ² T = 85-90 °C	98,6 ± 0,2	0,143 ± 0,003

¹ Es sind in den Tabellen immer die Messwerte der RT-Proben angegeben.

² Bedingungen der 1. Homogenisationsminute: p = 700 bar, T = 85-90 °C.

H_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.09.2001	SH, ML 5 Zyklen p = 1300 bar T = 90 °C (3 Ansätze)	205,4 ± 0,7	0,145 ± 0,003
I_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	16.01.2002	SH, ML 10 Zyklen p = 1580 bar T = 90 °C	143,8 ± 0,4	0,145 ± 0,003
K_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	16.01.2002	SH, ML 10 Zyklen p = 1400 bar T = 90 °C	153,0 ± 0,3	0,140 ± 0,003
L_RT	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	16.01.2002	SH, ML 10 Zyklen p = 1300 bar T = 90 °C	183,1 ± 0,7	0,133 ± 0,007

Herstellung mit dem Emulsions-Fällungs-Verfahren

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisations- bedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung¹ d (nm)	PI
11_RT/KS	1% CM 1% PL S100 0,25% NaGC (10% Cyclohexan)	31.01.2001	SE, MF 5 min p = 400-1000 bar (steigend) T = 15-25 °C	26,4 ± 0	0,130 ± 0,002
12_RT/KS	1% CM 1% PL S75 0,25% NaGC (10% Cyclohexan)	01.02.2001	SE, MF 5 min p = 400-1000 bar (steigend) T = 15-25 °C	65,5 ± 0,7	0,268 ± 0,011
13_RT/KS	5% CM 2% PL S100 0,5% NaGC (20% Cyclohexan)	01.02.2001	SE, MF 5 min p = 400-1000 bar (steigend) T = 15-25 °C	38,3 ± 0	0,106 ± 0,002
SE1_RT/KS	5% CM 2% PL S100 0,5% NaGC (20% Cyclohexan)	03.09.2003	SE, MF 3 min p = 900-950 bar T = 20-30 °C	64,0 ± 1,7	0,171 ± 0,024
SE2_RT/KS	5% CM 2% PL S100 0,5% NaGC (20% Cyclohexan)	10.09.2003	SE, MF 3 min p = 700-750 bar T = 15-25 °C	49,2 ± 0,7	0,181 ± 0,021
SE7_RT/KS	5% CM 2% PL S100 0,5% NaGC (20% Cyclohexan)	05.11.2003	SE, MF 5 min p = 450-950 bar (steigend) T = 25-30 °C	60,6 ± 0,3	0,265 ± 0,005
SE9_RT/KS	5% CM 5% Poloxamer 188 (20% Cyclohexan)	13.11.2003	SE, MF 5 min p = 450-950 bar (steigend) T = 20-25 °C	60,8 ± 0,1	0,144 ± 0,002

A.1.2 Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisationsbedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung¹ d (nm) PI	
Chomy-PLGC1 ²	5% CM 2,5% PL S100 ^{3,4} 0,6% NaGC	30.08.2000	SH, MF 5 min p = 900-1000 bar T = 85-90 °C	147,0 ± 0,1	0,148 ± 0,002
Chomy-PLGC2 ³	5% CM 3,2% PL S100 ^{3,4} 0,8% NaGC	30.08.2000	SH, MF 5 min p = 900-1000 bar T = 85-90 °C	197,0 ± 1,2	0,149 ± 0,012
V1_RT/KS	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	24.07.2002	SH, MF 5 min p = 900-1100 bar T = 75-85 °C	118,0 ± 0,3	0,145 ± 0,002
V2_RT/KS	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	31.07.2002	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 75-90 °C	109,1 ± 0,2	0,133 ± 0,003
1_RT/KS	5% CM 3,2% PL S100 ⁴ 0,8% NaGC	15.01.2001	SH, MF 5 min p = 720-820 bar T = 90-95 °C	117,2 ± 0,4	0,130 ± 0,04
2_RT/KS	5% CM 3,2% PL S75 ⁴ 0,8% NaGC	15.01.2001	SH, MF 5 min p = 650-85 bar T = 90 °C	136,7 ± 0,4	0,125 ± 0,003
3_RT/KS	5% CM 2,5% PL S100 ⁴ 0,6% NaGC	15.01.2001	SH, MF 5 min p = 650-780 bar T = 90 °C	132,3 ± 0,2	0,121 ± 0,003
4_RT/KS	5% CM 2,5% PL S75 ⁴ 0,6% NaGC	18.01.2001	SH, MF 5 min p = 600-750 bar T = 90-95 °C	149,8 ± 0,8	0,139 ± 0,003
5_RT/KS	5% CM 3,2% PL S100 ⁴	18.01.2001	SH, MF 5 min p = 820-840 bar T = 75-95 °C	167,0 ± 0,4	0,140 ± 0,004
6_RT/KS	5% CM 3,2% PL S75 ⁴	18.01.2001	SH, MF 5 min p = 750 bar T = 90-95 °C	176,8 ± 0,6	0,110 ± 0,005
7_RT/KS	5% CM 2,5% PL S100 0,6% NaGC	25.01.2001	SH, MF 5 min p = 700-800 bar T = 85-95 °C	131,8 ± 0,3	0,144 ± 0,004
8_RT/KS	5% CM 2,5% PL S75 0,6% NaGC	25.01.2001	SH, MF 5 min p = 740-820 bar T = 85-95 °C	161,2 ± 0,3	0,116 ± 0,005

³ Bei der Homogenisation der beiden Dispersionen ChomyPLGC1 und ChomyPLGC2 kam es zu stärkeren Temperaturschwankungen, woraus die vergleichsweise hohen mittleren Partikelgrößen resultieren.

⁴ Das Phospholipid wurde in der Lipidschmelze gelöst.

9_RT/KS	5% CM 1,25% PL S100 ⁴ 0,3% NaGC	25.01.2001	SH, MF 5 min p = 630-700 bar T = 85-95 °C	173,6 ± 0,6	0,127 ± 0,004
10_RT/KS	5% CM 1,25% PL S75 ⁴	25.01.2001	SH, MF 5 min p = 720 bar 90-95 °C	182,9 ± 0,3	0,126 ± 0,004
16_RT/KS*	5% CM 1% PVA	20.07.2001	SH, MF 5 min p = 800-900 bar T = 85 °C	204,6 ± 0,6	0,080 ± 0,005
17_RT/KS*	5% CM 2% PVA	20.07.2001	SH, MF 5 min p = 800-900 bar T = 85 °C	171,8 ± 0,4	0,086 ± 0,007
18_RT/KS*	5% CM 3% PVA	20.07.2001	SH, MF 5 min p = 900-1100 bar T = 85 °C	148,2 ± 0,5	0,106 ± 0,004
19_RT/KS*	5% CM 4% PVA	20.07.2001	SH, MF 5 min p = 900-1100 bar T = 85 °C	132,1 ± 0,3	0,112 ± 0,003
20_RT/KS*	5% CM 5% PVA	20.07.2001	SH, MF 5 min p = 900-1100 bar T = 85 °C	123,8 ± 0,3	0,120 ± 0,004
S1_RT/KS	5% CM 1% NaGC	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 75-85 °C	145,4 ± 0,3	0,124 ± 0,004
S2_RT/KS	5% CM 1,5% NaGC	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	136,4 ± 0,3	0,140 ± 0,003
S3_RT/KS	5% CM 2% NaGC	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	135,7 ± 0,4	0,115 ± 0,007
S4_RT/KS	5% CM 3% PVA	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1000-1200 bar T = 80-85 °C	156,8 ± 0,3	0,117 ± 0,005
S5_RT/KS	5% CM 4% PVA	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1000-1200 bar T = 80-85 °C	139,1 ± 0,3	0,133 ± 0,002
S6_RT/KS	5% CM 5% PVA	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1000-1200 bar T = 80-85 °C	125,6 ± 0,4	0,143 ± 0,004
S7_RT/KS	5% CM 3% Na-Caseinat	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	187,3 ± 0,5	0,107 ± 0,005
S8_RT/KS	5% CM 4% Na-Caseinat	07.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	183,5 ± 0,4	0,100 ± 0,005

S9_RT/KS	5% CM 1% Gelatine	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 75-85 °C	keine PCS-Messung möglich Mean (LD-PIDS) 5,9 µm	
S10_RT/KS	5% CM 2% Gelatine	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	401,0 ± 2,8	0,182 ± 0,014
S11_RT/KS	5% CM 4% Gelatinepoly- succinat	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	156,0 ± 0,3	0,131 ± 0,008
S12_RT/KS	5% CM 2% Poloxamin	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	186,9 ± 0,6	0,103 ± 0,008
S13_RT/KS	5% CM 3% Poloxamin	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	163,3 ± 0,3	0,121 ± 0,003
S14_RT/KS	5% CM 4% Poloxamin	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	151,6 ± 0,3	0,136 ± 0,004
S15_RT/KS	5% CM 2% Poloxamer 188	06.10.2003	SH, MF 3 min p = 900-1000 bar T = 70-80 °C	192,5 ± 0,5	0,105 ± 0,007
S16_RT/KS	5% CM 3% Poloxamer 188	06.10.2003	SH, MF 3 min p = 900-1000 bar T = 80-85 °C	167,7 ± 0,3	0,099 ± 0,006
S17_RT/KS	5% CM 4% Poloxamer 188	06.10.2003	SH, MF 3 min p = 900 bar T = 82-84 °C	164,1 ± 0,3	0,114 ± 0,005
S18_RT/KS	5% CM 4% Na-Oleat	06.10.2003	SH, MF 3 min p = 850-900 bar T = 80-82 °C	149,8 ± 0,3	0,108 ± 0,009
S19_RT/KS	5% CM 4% Tween 80	30.10.2003	SH, MF 3 min p = 850-900 bar T = 80-85 °C	155,6 ± 0,2	0,099 ± 0,008
S20_RT/KS	5% CM 4% Zuckerester	06.10.2003	SH, MF 3 min p = 800-850 bar T = 80-82 °C	170,0 ± 0,4	0,092 ± 0,008
S22_RT/KS	5% CM 3,2% PL E80 0,8% NaGC	06.10.2003	SH, MF 3 min p = 950-1100 bar T = 83-84 °C	162,2 ± 0,4	0,107 ± 0,007

A.1.3 Dispersionen mit unterschiedlicher Matrixzusammensetzung

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisierungsbedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung¹	
				d (nm)	PI
M1_RT/KS	5% CM 3,2% PL S100 0,8% NaGC	05.12.2001	SH, MF 5 min p = 850-870 bar T = 85-90 °C	134,1 ± 0,2	0,117 ± 0,004
M2_RT/KS	5% CN 3,2% PL S100 0,8% NaGC	05.12.2001	SH, MF 5 min p = 850 bar T = 85-90 °C	117,3 ± 0,1	0,108 ± 0,003
M3_RT/KS	5% CP 3,2% PL S100 0,8% NaGC	05.12.2001	SH, MF p = 860 bar T = 85-90 °C	138,2 ± 0,3	0,154 ± 0,002
M4_RT/KS	5% CO 3,2% PL S100 0,8% NaGC	05.12.2001	SH, MF 5 min p = 860 bar T = 65-75 °C	259,2 ± 0,7	0,120 ± 0,004
M5_RT/KS	2% CM 3% CN 3,2% PL S100 0,8% NaGC	05.12.2001	SH, MF 5 min p = 860 bar T = 85-90 °C	122,3 ± 0,3	0,119 ± 0,006
M6_RT/KS	4% CM 1% CN 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.12.2001	SH, MF 5 min p = 860-890 bar T = 85-90 °C	124,9 ± 0,2	0,095 ± 0,005
M7_RT/KS	4,5% CM 0,5% CN 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.12.2001	SH, MF 5 min p = 860-890 bar T = 85-90 °C	127,3 ± 0,6	0,085 ± 0,009
M8_RT/KS	4% CM 1% CO 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.12.2001	SH, MF 5 min p = 860-890 bar T = 85-90 °C	121,6 ± 0,3	0,100 ± 0,007
M9_RT/KS	3% CP 2% CN 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.12.2001	SH, MF 5 min p = 860-890 bar T = 85-90 °C	120,4 ± 0,2	0,072 ± 0,005
M10_RT/KS	2,5% CP 2,5% CN 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.12.2001	SH, MF 5 min p = 860-890 bar T = 85-90 °C	127,7 ± 0,2	0,081 ± 0,002
M11_RT/KS	2,5% CP 2,5% CO 3,2% PL S100 0,8% NaGC	07.12.2001	SH, MF 5 min p = 860-890 bar T = 85-90 °C	138,7 ± 0,2	0,037 ± 0,008
BL3_RT	5% Trilaurat 2,5% PL S100 0,6% NaGC	11.12.2002	SH, MF, 3 min p = 1000 bar T = 60-65 °C	116,3 ± 0,4	0,152 ± 0,003

A.1.4 Arzneistoffhaltige Dispersionen

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisations- bedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung¹ d (nm) PI	
AS1_RT/KS*	5% CM 0,5% Ibuprofen 3,2% PL S100 0,8% NaGC	18.07.2001	SH, MF 5 min p = 900-1200 bar T = 80-90 °C	102,0 ± 0,2	0,150 ± 0,002
AS2_RT/KS*	5% CM 0,5% Miconazol 3,2% PL S100 0,8% NaGC	18.07.2001	SH, MF 5 min p = 1000-1300 bar T = 80-90 °C	99,3 ± 0,2	0,152 ± 0,002
AS3_RT/KS*	5% CM 0,5% Etomidat 3,2% PL S100 0,8% NaGC	18.07.2001	SH, MF 5 min p = 1000-1300 bar T = 80-85 °C	93,8 ± 0,3	0,157 ± 0,003
AS4_RT/KS*	5% CM 0,05% Progesteron 3,2% PL S100 0,8% NaGC	18.07.2001	SH, MF 5 min p = 1000-1300 bar T = 80-90 °C	99,1 ± 0,2	0,137 ± 0,004
AS5_RT/KS	5% CM 0,5% Ibuprofen 3,2% PL S100 0,8% NaGC	28.03.2003	SH, MF 5 min p = 1150 bar T = 85 °C	92,0 ± 0,1	0,140 ± 0,002
AS6_RT/KS	5% CM 0,5% Ibuprofen 5% Poloxamin	28.03.2003	SH, MF 5 min p = 1150 bar T = 85 °C	157,9 ± 0,8	0,153 ± 0,006
AS7_RT/KS	4% CM 1% CO 0,5% Ibuprofen 3,2% PL S100 0,8% NaGC	28.03.2003	SH, MF 5 min p = 1150 bar T = 85 °C	96,5 ± 0,2	0,107 ± 0,003
SE10_RT/KS	5% CM 0,5% Ibuprofen 5% Poloxamer 188 (20% Cyclohexan)	17.11.2003	SE, MF 5 min p = 450-950 bar (steigend) T = 20-25 °C	57,5 ± 0,1	0,154 ± 0,005

A.1.5 Höherkonzentrierte Dispersionen

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisationsbedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung¹	
				d (nm)	PI
V3_RT/KS	10% CM 6,4% PL S100 1,6% NaGC	31.07.2002	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 75-80 °C	106,5 ± 0,2	0,136 ± 0,003
V4_RT/KS	8% CM 2% CO 6,4% PL S100 1,6% NaGC	08.08.2002	SH, MF 5 min p = 1100-1200 bar T = 80-85 °C	91,3 ± 0,2	0,176 ± 0,004
V5_RT/KS	6% CP 4% CN 6,4% PL S100 1,6% NaGC	31.07.2002	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 75-80 °C	110,9 ± 0,4	0,148 ± 0,005
V6_RT/KS	5% CP 5% CO 6,4% PL S100 1,6% NaGC	31.07.2002	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 75-80 °C	108,3 ± 0,2	0,125 ± 0,004
V7_RT/KS	10% CM 5% PVA	31.07.2002	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 75-80 °C	136,0 ± 0,3	0,133 ± 0,006
V8_RT/KS	10% CM 5% Na-Caseinat	31.07.2002	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 75-80 °C	183,3 ± 0,6	0,103 ± 0,006

A.1.6 Dispersionen für die Zellkulturuntersuchungen

	Zusammensetzung	Datum der Herstellung	Homogenisationsbedingungen	Partikelgröße (PCS) nach Herstellung¹	
				d (nm)	PI
ZK1_RT ⁵	10% CM 6,4% PL S100 1,6% NaGC	15.07.2004	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 85-87 °C	115,7 ± 0,4	0,120 ± 0,005
ZK2_RT ⁵	10% CN 6,4% PL S100 1,6% NaGC	15.07.2004	SH, MF 5 min p = 1100 bar T = 88 °C	105,9 ± 0,5	0,127 ± 0,006
ZK3_RT ⁵	10% CM 8% Poloxamer 188	15.07.2004	SH, MF 5 min p = 930-1000 bar T = 85 °C	143,5 ± 0,5	0,111 ± 0,006

⁵ Die Dispersionen wurden mit einer unkonservierten wässrigen Phase hergestellt.

A.2 Ausgewählte Ergebnisse der DSC-Untersuchungen

A.2.1 DSC-Untersuchung unterschiedlicher Cholesterylmyristat-Chargen in der Bulkphase

Die Proben wurden mit 5 °C/min von 20 auf 95 °C aufgeheizt (1. Heizen), auf 0 °C abgekühlt (Kühlen) und anschließend noch einmal auf 90 °C (2. Heizen) aufgeheizt. Die Werte der Charge 6254E (*kursiv*) wurden nicht in die Mittelung der Messwerte einbezogen.

1. Heizen (Originalprobe) von 20 auf 95 °C (5 °C/min)

Charge/ Datum der Messung	Peak (°C)	Schmelzen		smektisch-cholesterisch			cholesterisch-isotrop		
		Onset (°C)	Enthalpie (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)
120H84311 12.12.00	71,94	70,56	76,806	79,33	79,02	2,434	84,69	84,43	1,875
18H5150 16.03.01	71,38	70,43	76,403	77,74	77,32	2,412	83,00	82,18	1,952
95069 24.07.01	71,81	70,81	77,012	79,60	79,35	2,501	85,04	84,75	1,634
6254E(*) 20.07.01	71,29	69,81	69,950	75,84	73,60	0,842	81,04	79,11	1,344
9203E 16.02.04	71,24	70,34	77,072	78,76	78,55	2,280	84,26	83,99	1,631
Mittelwert ± SD	71,59 ± 0,34	70,54 ± 0,20	76,823 ± 0,302	78,86 ± 0,82	78,56 ± 0,89	2,407 ± 0,093	84,25 ± 0,89	83,84 ± 1,15	1,773 ± 0,165

2. Kühlen von 95 auf 0 °C (5 °C/min)

Charge/ Datum der Messung	isotrop-cholesterisch			cholesterisch-smektisch			Kristallisation		
	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)
120H84311 12.12.00	84,17	84,38	-2,062	78,63	78,83	-2,483	34,91	37,03	-59,232
18H5150 16.03.01	81,88	82,28	-2,104	76,68	76,99	-2,647	30,66	33,81	-55,669
95069 24.07.01	84,49	84,71	-2,002	78,95	79,16	-2,380	45,19	47,47	-62,718
6254E(*) 20.07.01	80,13	81,11	-2,496	74,28	75,47	-3,311	30,90	34,25	-56,135
9203E 16.02.04	83,80	83,99	-1,933	78,20	78,39	-2,558	32,22	34,98	-58,542
Mittelwert ± SD	83,59 ± 1,17	83,84 ± 1,08	-2,025 ± 0,074	78,12 ± 1,00	78,34 ± 0,96	-2,517 ± 0,113	35,75 ± 6,54	38,32 ± 6,24	-59,040 ± 2,897

3. Heizen von 0 auf 95 °C (5 °C/min)

Charge/ Datum der Messung	Peak (°C)	Schmelzen		smektisch-cholesterisch			cholesterisch-isotrop		
		Onset (°C)	Enthalpie (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	Enthalpie (J/g)
12H84311 12.12.00	71,23	70,08	76,110	79,29	79,05	2,472	84,69	84,43	1,719
18H5150 16.03.01	71,18	70,05	76,197	77,54	77,25	2,448	82,63	82,19	1,828
95069 24.07.01	71,45	70,27	76,153	79,64	79,40	2,332	85,00	84,77	1,897
6254E(*) 20.07.01	70,19	68,57	67,987	74,94	72,49	1,499	80,57	78,03	1,777
9203E 16.02.04	70,95	69,79	75,668	78,76	78,57	2,326	84,26	84,02	2,340
Mittelwert ± SD	71,20 ± 0,21	70,05 ± 0,20	76,032 ± 0,245	78,81 ± 0,92	78,57 ± 0,94	2,395 ± 0,076	84,15 ± 1,05	83,85 ± 1,15	1,946 ± 0,273

Die Phasenübergänge der Charge 6254E waren deutlich breiter und zu tieferen Phasenübergangstemperaturen verschoben (Abb. A.2.1). Außerdem wies diese Charge einen eigentümlichen Geruch auf, so dass die beobachteten Besonderheiten auf eine Verunreinigung zurückgeführt werden können.

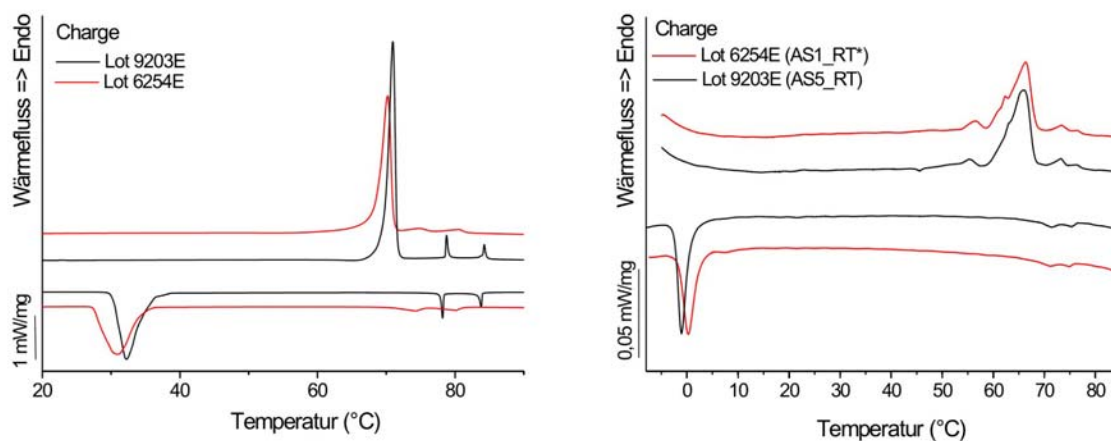


Abbildung A.2.1: DSC-Heiz- und Kühlkurven (5 °C/min) unterschiedlicher Cholesterylmyristat-Chargen im Bulk (links) und in kolloidalen Dispersionen (rechts, Messung nach Herstellung der Dispersionen).

Das Phasenverhalten der kolloidalen Dispersionen, die mit dieser Charge hergestellt wurden, unterschied sich im Vergleich zum Rohmaterial deutlich weniger von dem mit anderen Chargen unter ähnlichen Bedingungen hergestellten Dispersionen gleicher Zusammensetzung (Abb. A.2.1). Während in den mit PVA stabilisierten Dispersionen die flüssigkristallinen Phasenübergangstemperaturen doch zu deutlich niedrigeren Temperaturen verschoben waren, wurden in den mit Phospholipiden stabilisierten ibuprofenbeladenen Dispersionen keine Unterschiede bei den flüssigkristallinen Phasenübergängen beobachtet. Die mit der

verunreinigten Cholesterylmyristat-Charge hergestellten Dispersion zeigten jedoch eine geringfügig erhöhte Kristallisationstemperatur.

In der folgenden Tabelle sind die DSC-Phasenübergangstemperaturen (5 °C/min) 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen, die mit unterschiedlichen Chargen hergestellt wurden (Messungen nach Herstellung der Dispersionen) angegeben:

	18_RT* (3% PVA)		S4_RT (3% PVA)		20_RT* (5% PVA)		S6_RT (5% PVA)	
	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)
Schmelzen (2. Heizen)	66,8	63,7	68,3	64,9	66,1	63,0	66,8	62,9
sm-ch	74,5	73,3	76,9	75,0	74,1	71,2	76,2	73,8
ch-i	80,3	79,1	82,7	81,9	80,5	79,1	82,7	80,6
Kristallisation	1,5	5,6	-0,2	6,6	0,1	4,2	-0,4	4,8

	AS1_RT*		AS5_RT	
	3,2% S100, 0,8% NaGC 0,5% Ibuprofen			
	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)
Schmelzen (2. Heizen)	66,4	60,4	66,0	61,5
sm-ch	73,4	71,3	73,3	71,1
ch-i	76,5	73,7	76,6	73,5
Kristallisation	0,3	2,5	-1,1	0,7

Es könnte sich um eine leicht flüchtige bzw. thermisch instabile Verunreinigung handeln, die sich bei längerer thermischer Belastung während der Herstellung zersetzt bzw. verdampft. Möglich wäre auch, dass eine amphiphile Substanz (z.B. freie Fettsäuren oder Cholesterol) vorliegt, die sich bei Dispergierung in der wässrigen Phase bzw. in der Grenzschicht anreichert. Dass die mit Phospholipid stabilisierten Dispersionen geringere Unterschiede im Phasenverhalten zeigten, könnte darauf zurückgeführt werden, dass das eingesetzte Phospholipid S100 keine Reinsubstanz ist, sondern eine Reihe weiterer Begleitstoffe enthält, unter anderem freie Fettsäuren.

Alle Dispersionen, die mit der verunreinigten Charge hergestellt wurden, sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

A.2.2 DSC-Phasenübergangstemperaturen und Enthalpien ausgewählter schmelzhomogenisierter 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen

Die Dispersionen wurden mit 5 °C/min auf 90 °C aufgeheizt (1. Heizen), auf -8/-13 °C abgekühlt und anschließend noch einmal auf 90 °C aufgeheizt (2. Heizen), Messungen nach Herstellung der Dispersionen.

	Art und Konzentration des Stabilisatorsystems (%)	Schmelzen (2. Heizen)			smektisch-cholesterischer Übergang (2. Heizen)			cholesterisch-isotroper Übergang (2. Heizen)			Kristallisation		
		Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)
1_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	67,9	63,0	2,69	78,5	77,1	0,18	81,5	n.b.	0,06	6,6/0,3	10,9/2,9	-1,77
M1_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	68,2	64,3	2,95	78,4	76,0	0,22	82,0	79,3	0,09	7,1/0,2	10,1/2,8	-2,74
2_RT	3,2% S75, 0,8% NaGC	68,1	63,0	3,39	78,4	75,2	0,19	82,2	80,2	0,08	7,0/1,4	12,2/4,0	-2,16
S22_RT	3,2% E80, 0,8% NaGC	68,0	64,4	2,94	77,1	74,8	0,13	81,9	78,9	0,12	7,0/3,6	11,4/6,8	-1,78
S18_RT	4% Na-Oleat	64,4 ¹⁾	63,3 ¹⁾	3,23	75,9	73,7	0,24	80,5	78,5	0,12	8,8/1,3	12,6/4,3	-2,02
S20_RT	4% Zuckerester	66,4	63,3	2,51	77,2	75,6	0,17	80,3	n.b.	0,10	5,2/0,6/-4,9	10,3/5,4/-1,5	-1,03
S3_RT	2% NaGC	67,3	62,6	2,53	76,6	74,7	0,08	82,7	79,9	0,06	-1,6	3,2	-0,55
S14_RT	4% Poloxamin 908	67,7	64,4	3,38	76,5	71,3	0,43	82,9	82,3	0,17	3,2	7,7	-1,82
S17_RT	4% Poloxamer 188	66,7	62,5	2,51	76,5	76,8	0,11	81,6	79,5	0,08	2,3	7,7	-1,32
S19_RT	4% Tween 80	67,1	64,6	3,33	74,4	73,3	0,16	78,5	77,3	0,11	8,8/6,1	12,2/5,7	-2,05
19_RT*	4% PVA	66,6	63,5	3,16	74,2	72,6	0,11	80,8	79,3	0,11	0,9	4,9	-0,62
S5_RT	4% PVA	66,9	63,4	2,83	76,5	73,7	0,13	82,4	80,2	0,10	0,0	5,1	-0,49
S8_RT	4% Natriumcaseinat	69,1	66,9	3,07	76,6	74,6	0,10	83,2	81,4	0,11	-1,3	4,0	-0,66
S11_RT	4% Gelatinepolysuccinat	68,6	65,6	3,22	76,6	72,5	0,23	83,5	82,2	0,19	0,9	5,9	-1,19

¹⁾ Es wurde ein multiples Schmelzen beobachtet. Es ist die Schmelztemperatur des Hauptpeaks angegeben.

A.2.3 DSC-Phasenübergangstemperaturen und Enthalpien der Dispersionen mit einer Matrix anderer Cholesterolester bzw. Mischungen

Alle Dispersionen enthielten 5% Cholesterolester und wurden mit 3,2% Phospholipid S100 und 0,8% Natriumglycocholat stabilisiert. Die Dispersionen wurden mit 0,5 °C/min auf 60 (CO) bzw. 90 °C aufgeheizt (1. Heizen), auf -8/-13 °C abgekühlt und anschließend noch einmal auf 60 bzw. 90 °C aufgeheizt (2. Heizen), Messungen nach Herstellung der Dispersionen.

	Zusammensetzung der Matrix		Schmelzen (2. Heizen)			smektisch-cholesterischer Übergang (2. Heizen)			cholesterisch-isotroper Übergang (2. Heizen)			Kristallisation		
			Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)
M1_RT	CM	100%	67,9 ¹⁾	63,5	2,764	78,1	76,9	0,158	81,8	80,0	0,051	10,5/1,7	13,4/3,6	-1,762
M2_RT	CN	100%	kein Schmelzpeak				n.b.		87,9	86,0	0,041	keine Kristallisation		
M3_RT	CP	100%	73,6	69,5	3,269	73,5 ²⁾	75,2	-0,182	77,0 ²⁾	77,7	-0,053	24,9/15,7	27,0/16,1	-2,147
M4_RT	CO	100%	kein Schmelzpeak				n.b.		38,3	33,9	0,119	keine Kristallisation		
M5_RT	CM+CN	40+60%	kein Schmelzpeak			72,2	n.b.	0,053	84,3	n.b.	0,055	keine Kristallisation		
M6_RT	CM+CN	80+20%	61,5 ¹⁾	46,1	2,300	76,4	72,7	0,130	82,0	79,1	0,062	8,1/-3,0	11,0/1,4	-0,739
M7_RT	CM+CN	90+10%	63,7	52,7	2,393	76,8	74,8	0,139	81,9	78,8	0,060	8,0/-1,7	11,0/1,2	-1,397
M8_RT	CM+CO	80+20%	64,3	55,2	2,280	74,2	68,7	0,217	76,3	n.b.	0,052	-3,0	-0,1	-1,062
M9_RT	CP+CN	60+40%	59,0 ¹⁾	40,3	2,440		n.b.		79,4	74,3	0,221	3,2	8,6	-1,047
M10_RT	CP+CN	50+50%	54,4 ¹⁾	37,9	1,749		n.b.		75,4	65,0	0,018	-1,3	6,0	-0,770
M11_RT	CP+CO	50+50%	50,2	63,8	1,598		n.b.		59,7	54,5	0,143	-1,1	4,6	-0,660

¹⁾ Es wurde ein mehrgipfliges Schmelzereignis beobachtet. Es ist die Schmelztemperatur des Hauptpeaks angegeben.

²⁾ Daten im Kühlprozess ermittelt.

A.2.4 DSC-Phasenübergangstemperaturen und Enthalpien der arzneistoffbeladenen Dispersionen

Die Dispersionen wurden mit 0,5 °C/min auf 90 °C aufgeheizt (1. Heizen), auf -8/-13 °C abgekühlt und anschließend noch einmal auf 90 °C aufgeheizt (2. Heizen), Messungen nach Herstellung der Dispersionen.

Zusammensetzung der Dispersionen ¹⁾		Schmelzen (2. Heizen)			smektisch-cholesterischer Übergang (2. Heizen)			cholesterisch-isotroper Übergang (2. Heizen)			Kristallisation		
		Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)	Peak (°C)	Onset (°C)	ΔH (J/g)
AS2_RT*	0,5% Miconazol	66,3	60,9	2,47	72,1	70,6	0,09	74,9	72,4	0,03	-0,8	0,9	-1,72
AS3_RT*	0,5% Etomidat	65,9	60,6	2,16	70,4	69,1	0,04	72,6	66,4	0,02	-1,0	0,7	-1,60
AS4_RT*	0,05% Progesteron	66,4	60,8	2,28	75,9	73,3	0,14	78,9	76,4	0,04	7,7/1,0	/3,4	-1,62
AS1_RT*	0,5% Ibuprofen	66,4	60,4	2,47	73,4	71,3	0,11	76,5	73,5	0,04	7,5/0,3	/2,5	-1,53
AS5_RT	0,5% Ibuprofen	66,0	61,5	2,60	73,3	71,1	0,11	76,6	73,5	0,04	-1,1	0,7	-1,66
AS6_RT	0,5% Ibuprofen	65,8	61,2	2,63	73,3	71,1	0,18	76,6	73,5	0,09	3,1	6,6	-1,72
AS7_RT	4% Poloxamin												
	0,5% Ibuprofen	62,4	55,2	2,36	67,9	n.b.	0,11		n.b.		n.b. ²⁾	n.b.	n.b.
	4% CM, 1% CO												

¹⁾ Wenn nicht anders angegeben, enthielten die Dispersionen 5% Cholesterylmyristat als Matrixlipid sowie 3,2% S100 und 0,8% NaGC als Stabilisatoren.

²⁾ Keine vollständige Kristallisation beim Kühlen auf -13 °C.

A.3 Röntgenkleinwinkelreflexe ausgewählter Dispersionen

A.3.1 Einfluss der Lagerzeit auf den smektischen Schichtabstand ausgewählter Dispersionen

Röntgenkleinwinkelreflexe smektischer Nanopartikel nach unterschiedlichen Lagerungszeiten (Messung bei 20 °C). Die Dispersionen 1-10_RT wurden im Januar, die Dispersionen 16-20_RT im Juli 2001 hergestellt. Alle Dispersionen enthielten 5% Cholesterylmyristat als Matrixlipid. Für das kristalline Cholesterylmyristat (Bulkphase) wurde bei 20 °C sowohl 2001 als auch 2002 ein Schichtabstand von 50,7 Å gemessen.

Stabilisatorsystem		2001 smekt. Reflex	Messungen 2002 smekt. Reflex	2003 smekt. Reflex
1_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	35,1		
2_RT	3,2% S75, 0,8% NaGC	35,1		35,3
3_RT	2,5% S100, 0,6% NaGC	35,3		35,3
4_RT	2,5% S75, 0,6% NaGC	35,0		35,1
5_RT	3,2% S100	35,3		35,1
6_RT	3,2% S75	35,1		35,2
9_RT	1,25% S100, 0,3% NaGC	35,3		35,1
10_RT	1,25% S75, 0,3% NaGC	35,3		35,1
16_RT*	1% PVA		35,2	35,1
17_RT*	2% PVA		35,1	35,1
18_RT*	3% PVA		35,1	35,1
19_RT*	4% PVA		35,1	35,1
20_RT*	5% PVA		35,1	34,9

A.3.2 Abhängigkeit des smektischen Schichtabstandes von der Temperatur

Röntgenkleinwinkelreflexe 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren in Abhängigkeit von der Temperatur im Heiz- und Kühlprozess.

T (°C)	S22_RT (3,2% E80, 0,8% NaGC)	S3_RT (2% NaGC)	S8_RT (4% NaC)	S17_RT (4% POL 188)	S18_RT (4% NaOleat)	S19_RT (4% Tween)	S20_RT (4% ZT)
<i>Heizen</i>							
20	34,7	35,0	34,8	35,1	35,1	35,1	34,7
30	34,6	34,6	34,6	35,0	34,9	34,9	34,6
40	34,3	34,3	34,3	34,6	34,7	34,7	34,3
50	34,0	34,0	34,0	34,2	34,4	34,2	34,0
60	33,6	33,7	33,6	33,8	34,0	33,8	33,4
70	33,3	33,3	33,1	33,5	33,6	33,4	33,1
<i>Kühlen</i>							
70	33,1	33,3		33,5	33,6	33,5	33,3
60	33,6	33,6	33,6	33,8	34,0	33,9	33,7
50	34,0	34,0	34,0	34,2	34,4	34,3	34,1
40	34,4	34,4	34,4	34,6	34,7	34,7	34,3
30	34,6	34,6	34,7	35,0	34,8	35,0	34,5
20	34,8	34,7	34,8	35,1	35,1	35,2	34,8

A.3.3 Röntgenkleinwinkelreflexe von Cholesterylmyristat-Dispersionen mit verschiedenen Stabilisatoren

Röntgenkleinwinkelreflexe 5%iger Cholesterylmyristat-Dispersionen mit unterschiedlichen Stabilisatoren (Messung bei 20 °C, 2003).

Dispersion	Stabilisatorsystem	Lagerungszeit vor der Messung	Schichtabstand d (Å)	
			smektischer Reflex	kristalliner Reflex (1. Ordnung)
E_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	29 Monate	35,2	
A_RT	3,2% S100, 0,8% NaGC	29 Monate	35,1	
M1_RT	3,2% S100; 0,8% NaGC	24 Monate	35,2	50,5
2_RT	3,2% S75; 0,8% NaGC	35 Monate	35,3	
3_RT	2,5% S100; 0,6% NaGC	35 Monate	35,3	
4_RT	2,5% S75; 0,6% NaGC	35 Monate	35,1	
5_RT	1,25% S100; 0,3% NaGC	35 Monate	35,1	
6_RT	1,25% S75; 0,3% NaGC	35 Monate	35,2	
9_RT	3,2% S100	35 Monate	35,1	
10_RT	3,2% S75	35 Monate	35,1	
S22_RT	3,2% E80; 0,8% NaGC	2 Monate	35,1	50,3
16_RT*	1% PVA	29 Monate	35,1	
17_RT*	2% PVA	29 Monate	35,1	
18_RT*	3% PVA	29 Monate	35,1	
19_RT*	4% PVA	29 Monate	35,1	
20_RT*	5% PVA	29 Monate	34,9	
S4_RT	3% PVA	16 Monate	34,9	
S5_RT	4% PVA	16 Monate	34,9	
S6_RT	5% PVA	16 Monate	34,9	50,5
S7_RT	3% NaC	16 Monate	35,1	
S8_RT	4% NaC	16 Monate	35,1	50,8
S11_RT	4% GEL	16 Monate	35,1	50,9
S12_RT	2% TET 908	16 Monate	35,1	51,1
S13_RT	3% TET 908	16 Monate	35,1	50,9
S14_RT	4% TET 908	16 Monate	35,1	
S15_RT	2% POL 188	2 Monate	35,1	
S16_RT	3% POL 188	2 Monate	35,1	
S17_RT	4% POL 188	2 Monate	35,1	
S1_RT	1,0% NaGC	16 Monate	34,8	
S2_RT	1,5% NaGC	16 Monate	34,9	
S3_RT	2,0% NaGC	16 Monate	35,0	50,5
S18_RT	4% Na-Oleat	2 Monate	35,1	50,3 ¹⁾
S19_RT	4% Tween 80	1 Monat	35,1	51,2
S20_RT	4% Zuckerester	2 Monate	35,1	49,8

¹⁾ Die kristallinen Reflexe zeigten jeweils eine Schulter bei kleineren Winkeln, Reflexlage 59,4 (1. Ordnung).

²⁾ Der kristalline Reflex 1. Ordnung ist nicht symmetrisch.

A.4 Ergebnisse der HPLC-Messungen

A.4.1 Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen im Rahmen der Voruntersuchungen (Januar/Februar 2002)

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde der Gehalt von zwei arzneistoffhaltigen Dispersionen (AS1_RT* – Ibuprofen und AS3_RT* – Etomidat) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. A.4.1 zusammengestellt. Es wurden jeweils 200-600 mg Dispersion in 5-ml-Maßkolben genau eingewogen und mit Tetrahydrofuran/Acetonitril-Gemischen (Cholesterylmyristat und Ibuprofen 80:20, Etomidat 50:50, v/v) auf 5 ml aufgefüllt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden unterschiedlich hoch konzentrierte Lösungen der entsprechenden Substanzen in dem gleichen Lösungsmittel vermessen. Die Kalibriergeraden sind in Abbildung A.4.1 gezeigt.

Dispersion	Einwaage (mg/ml)	n	Peakfläche (w.E.)	Retentionszeit (min)	Gehalt (mg/g Disp.)	Gehalt (% m/m CM ¹)
<i>Gehaltsbestimmung Cholesterylmyristat</i>						
AS1_RT*	0,080	3	455,30 ± 14,10	14,70 ± 0,10	44,9 ± 1,5	89,8 ± 3,0
AS3_RT*	0,081	3	418,72 ± 10,78	14,76 ± 0,16	40,5 ± 1,1	81,0 ± 2,2
<i>Gehaltsbestimmung der Arzneistoffe</i>						
AS1_RT*	0,1004	3	56,31 ± 0,66	2,50 ± 0,01	5,16 ± 0,06	11,3 ± 0,4
(Ibuprofen)	0,1204	3	65,48 ± 1,04	2,51 ± 0,01	5,0 ± 0,08	
AS3_RT*	0,041	3	358,59 ± 14,16	6,06 ± 0,02	3,65 ± 0,13	9,0 ± 0,4
(Etomidat)	0,042	3	364,84 ± 14,24	6,02 ± 0,02	3,62 ± 0,13	

A.4.2. Gehaltsbestimmung von Cholesterylmyristat, Progesteron, Etomidat und Ibuprofen (Mai/Juni 2004)

Abgesehen von der etomidathaltigen Dispersion mit einer Probe von 30 µl Dispersion in 470 µl Lösungsmittel, wurden jeweils 50 µl Dispersion in 450 µl Tetrahydrofuran/Acetonitril (80:20 V/V) gelöst. Von jeder Dispersion wurden drei Lösungen hergestellt und jeweils dreimal vermessen. Die Ergebnisse sind in Tab. A.4.2. dargestellt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden Verdünnungen von Stammlösungen der entsprechenden Substanz im gleichen Lösungsmittel hergestellt. Die Kalibriergeraden sind in Abbildung A.4.1 gezeigt.

Dispersion	Volumen (µl/ml)	n	Peakfläche (w.E.)	Retentionszeit (min)	Gehalt (mg/ml Disp.)	Gehalt (% m/m CM ¹)
<i>Gehaltsbestimmung Cholesterylmyristat</i>						
AS3_RT*	100	9	233,21 ± 12,0	3,78 ± 0,01	39,2 ± 2,3	78,4 ± 4,6
AS4_RT*	100	9	231,3 ± 9,53	3,78 ± 0,01	38,9 ± 1,8	77,8 ± 3,6
AS5_RT	100	9	234,72 ± 8,80	3,65 ± 0,01	39,5 ± 1,7	79,0 ± 3,4
AS6_RT	100	9	231,19 ± 10,96	3,68 ± 0,04	38,8 ± 2,1	77,6 ± 4,5
AS7_RT	100	9	225,97 ± 13,13	3,87 ± 0,01	37,9 ± 2,5	75,8 ± 4,4
C_RT	100	9	250,87 ± 9,03	3,74 ± 0,02	42,5 ± 1,70	85,0 ± 3,4
E_RT	100	9	262,49 ± 5,34	3,68 ± 0,01	44,7 ± 1,00	89,4 ± 2,0
<i>Gehaltsbestimmung der Arzneistoffe</i>						
AS3_RT*	100	5	468,32 ± 50,11	3,97 ± 0,04	2,89 ± 0,03	7,4 ± 0,5
(Etomidat)	60	3	263,22 ± 8,95		2,88 ± 0,01	

¹ Der prozentuale Gehalt von Cholesterylmyristat ist auf den Sollwert (50 mg/ml) bezogen. Im Unterschied dazu ist der Arzneistoffgehalt auf den mittels HPLC bestimmten Cholesterylmyristat-Gehalt angegeben.

AS4_RT* (Progesteron)	100	8	68,86 ± 4,0	8,26 ± 0,13	0,32 ± 0,002	0,82 ± 0,04
AS5_RT (Ibuprofen)	100	8	653,0 ± 24,15	2,45 ± 0,05	3,96 ± 0,02	10,0 ± 0,4
AS6_RT (Ibuprofen)	100	9	690,54 ± 23,62	2,48 ± 0,004	4,22 ± 0,02	10,9 ± 0,6
AS7_RT (Ibuprofen)	100	9	689,78 ± 18,53	2,49 ± 0,01	4,22 ± 0,01	n.b.

A.4.3 Anmerkungen zu den Berechnungen

Die Kalibriergeraden wurde durch lineare Regression der Messwerte der Lösungen der reinen Substanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt. Die Berechnung des Gehalts der Arzneistoffe sowie von Cholesterylmyristat in den Dispersionen erfolgte dann rechnerisch mit Hilfe der Geradengleichungen der jeweiligen Kalibriergeraden (die Werte A und B sind in den Graphiken mit aufgeführt):

$$x = \frac{(y - A)}{B}$$

- y Peakfläche der zu bestimmenden Substanz,
- A Schnittpunkt der Kalibriergeraden mit der y-Achse,
- B Steigung der Kalibriergeraden und
- x gesuchter Gehalt (mg/ml).

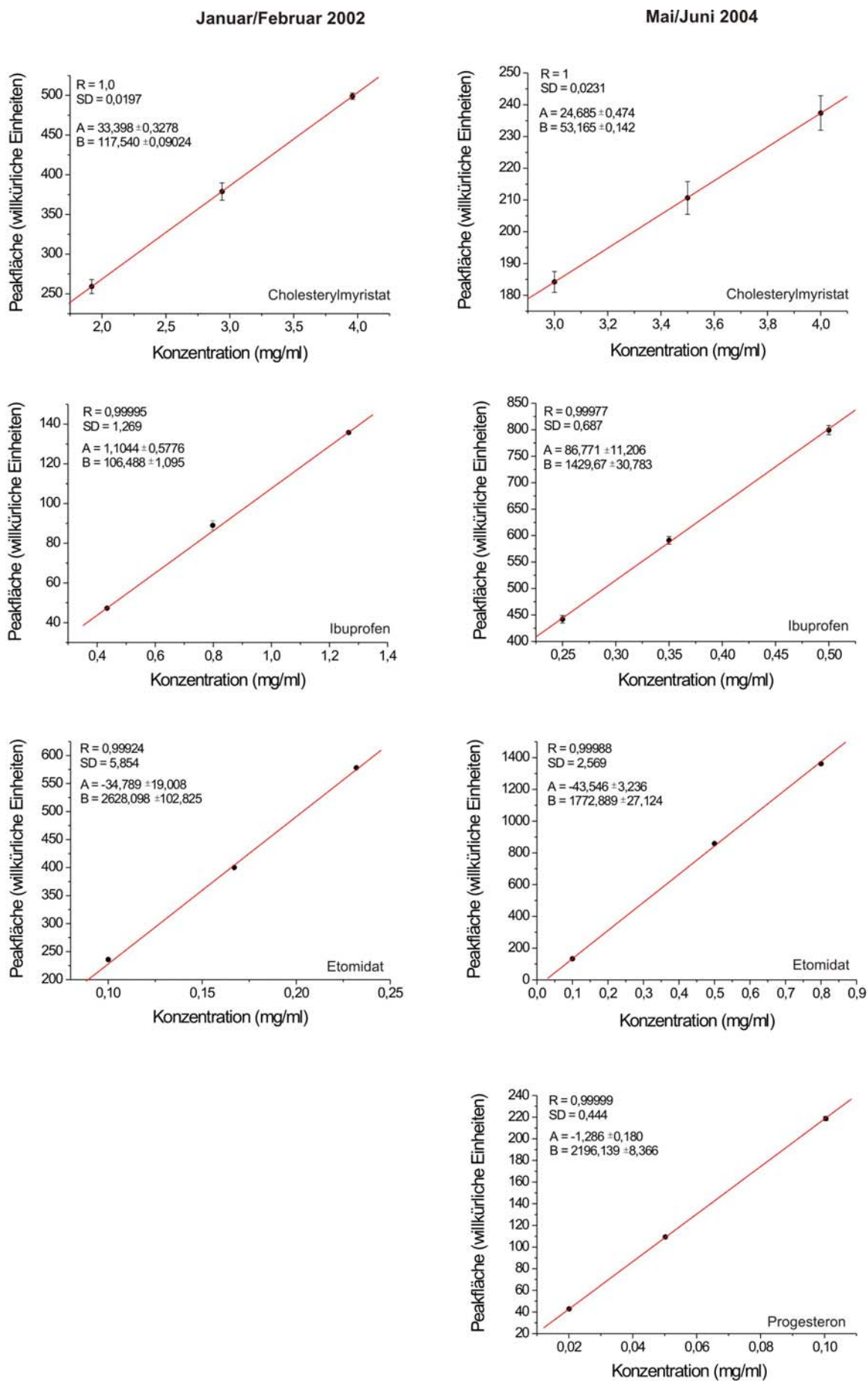


Abbildung A.4.1: Kalibriergeraden der jeweiligen Gehaltsbestimmungen.

A.5 Gleichungen und Formeln der Statistik

A.5.1 Statistische Parameter

Mittelwert $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$

n Anzahl der Messwerte

x_i Messwert

Varianz $\sigma = \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$

\bar{x} Mittelwert

σ Varianz

s Standardabweichung

Standardabweichung $s = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

s_{rel} relative Standardabweichung

relative Standardabweichung $s_{i-rel} = \frac{s}{\bar{x}_i}$

relative Standardabweichung (Fehlerfortpflanzung) $s_{rel} = \sqrt{s_{1-rel}^2 + s_{2-rel}^2}$

A.5.2 Signifikanzprüfungen

Prüfung auf Gleichheit von Varianzen (F-Test)

Hypothese Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und Freiheitsgraden von $f_{1,2} = n_{1,2} - 1$ unterscheiden sich die Varianzen nur zufällig voneinander.

$$F_b = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Die Hypothese wird angenommen, d.h. die Varianzen unterscheiden sich **nicht** signifikant, wenn F_b kleiner ist als der entsprechende Tabellenwert F_t .

Prüfung auf Gleichheit von Mittelwerten (t-Test)

Unterscheiden sich die Varianzen nicht signifikant, so spricht man von einer Homogenität der Streuung. In diesem Fall kann überprüft werden, ob die Mittelwerte sich nur zufällig unterscheiden.

Hypothese Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und einem Freiheitsgrad von $f = n_1 + n_2 - 2$ unterscheiden sich die Mittelwerte nur zufällig voneinander.

$$t_b = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{mit} \quad s_d = \sqrt{\frac{s_1^2 (n_1 - 1) + s_2^2 (n_2 - 1)}{f}}$$

Die Hypothese wird angenommen, d.h. die Mittelwerte unterscheiden sich **nicht** signifikant, wenn t_b kleiner ist als der entsprechende Tabellenwert t_t .

A.6 Verwendete Abkürzungen

ACN	Acetonitril
bzw.	beziehungsweise
ch	cholesterische Phase
CM	Cholesterylmyristat
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CN	Cholesterylnonanoat
CO	Cholesteryloleat
CP	Cholesterylpalmitat
cr	kristalline Phase
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
engl.	englisch
GEL	Gelatinepolysuccinat
HDL	Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoproteins)
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i	isotrope Phase
k.A.	Keine Angaben
KS	Kühlschrank (Lagerung bei 4 °C)
LDL	Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoproteins)
LD-PIDS	Laserdiffraktometrie mit PIDS (polarization intensity differential scattering)-Technologie
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
MF	Microfluidizer
MG	Molekulargewicht
ML	Micron-Lab
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid
n.b.	nicht bestimmt
n.g.	nicht gemessen
n.H.	nach Herstellung
NaC	Natriumcaseinat
NaGC	Natriumglycocholat
nH	nach Herstellung
o.g.	oben genannt
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEG	Polyethylenglycol
PI	Polydispersitätsindex
PL	Phospholipid
POL	Poloxamer
PVA	Polyvinylalkohol
RES	retikuloendotheliales System
rpm	Umdrehungen je Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur (Lagerung bei 23 °C)
s.u.	siehe unten
SE	Solvent-Evaporation-Verfahren (Fällungsverfahren)
SH	Schmelzhomogenisation
SLN	fest Lipid-Nanopartikel (solid lipid nanoparticles)
sm	smektische Phase
sog.	sogenannt
SRB	Sulforhodamin-B
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TET	Poloxamin (Tetronic)
THF	Tetrahydrofuran
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins)
vs.	Im Vergleich zu (versus)
w.E.	willkürliche Einheiten

LEBENS LAUF

Name: Judith Kuntsche
Geburtsdatum: 16. August 1968
Geburtsort: Schwerin, Deutschland

Ausbildung

09/1975 – 08/1985 Allgemeinbildende polytechnische Oberschule in Schwerin and Berlin
09/1985 – 07/1988 Pädagogische Fachschule für Kindergärtnerinnen “Friedrich Fröbel” in Berlin
09/1989 – 07/1991 zweiter Bildungsweg (Volkshochschule) zur Erlangung des Abiturs in Berlin
09/1991 – 09/1992 Umschulung zur "Europa-Sekretärin" in Berlin
10/1992 – 04/1997 Pharmaziestudium an der Humboldt Universität zu Berlin
09/1997 – 08/1998 Pharmaziepraktikantin in der “Apotheke zum Kreuz” Berlin
01/1999 Approbation als Apotheker
06/2000 - 10/2004 Doktorandin am Institut für Pharmazie (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie), Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/2004 - 10/2005 Forschungsprojekt im Rahmen eines EU Programms an der Universität Kuopio (Finnland)

Berufserfahrungen

09/1988 – 07/1991 Kindergärtnerin in Berlin
12/1998 – 05/2000 Apothekerin in der “Viereck-Apotheke”
Berlin (Verantwortungsbereich: Herstellung von applikationsfertigen Infusionslösungen für die ambulante Chemotherapie)
06/2000 – 10/2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie), Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/2004 - 10/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Kuopio, Finnland
seit 11/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie), Friedrich-Schiller-Universität Jena

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Judith Kuntsche

Jena, den 18.04.2006